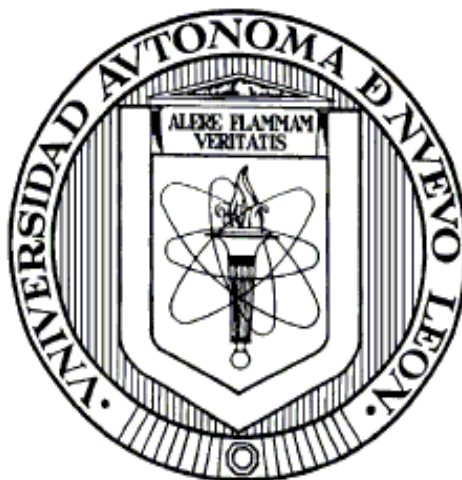


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS:

EVALUACIÓN DEL EFECTO CELULAR Y MOLECULAR DE DERIVADOS DE
AZETIDIN-2-ONAS SOBRE LÍNEAS CELULARES CANCERÍGENAS.

PRESENTADO POR:

QFB. Fabián Eliseo Olazarán Santibáñez

Director de tesis:

Dr. Isaías Balderas Rentería

Co-Director de tesis:

Dr. Gildardo Rivera Sánchez

Lugar de Realización:

Escuela de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas,

Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica,

Av. Guerrero y Progreso s/n, Colonia Treviño, Monterrey, Nuevo León

Fecha: 20 de Junio de 2013

“EVALUACIÓN DEL EFECTO CELULAR Y MOLECULAR DE DERIVADOS DE
AZETIDIN-2-ONAS SOBRE LÍNEAS CELULARES CANCERÍGENAS”

Aprobación de la tesis

Dr. Isaías Balderas Rentería

Presidente

Secretario

Vocal

Dra. María Teresa GarzaGonzález

Subdirectora de Estudios de Posgrado

“EVALUACIÓN DEL EFECTO CELULAR Y MOLECULAR DE DERIVADOS DE
AZETIDIN-2-ONAS SOBRE LÍNEAS CELULARES CANCERÍGENAS”

Revisión de la tesis

Comité tutorial

Dr. Edgar Abraham García Zepeda

Asesor de tesis

Dr. VíctorManuel Rosas García

Asesor de tesis

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos

Asesor de tesis

Dra. María Teresa Garza González

Subdirectora de Estudios de Posgrado

RESUMEN

Fabián Eliseo Olazarán Santibáñez

Fecha de Graduación: Julio 2013

Universidad Autónoma Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del proyecto:

Evaluación del efecto celular y molecular de derivados de azetidin-2-onas sobre líneas celulares cancerígenas.

Número de página:59

Candidato para el grado de Maestro en Ciencias con orientación en Farmacia

Área de estudio: Farmacia

Propósito y Método de Estudio: El cáncer es un crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos, que puede originarse a partir de cualquier tipo de célula, en cualquier tejido corporal. A nivel mundial el cáncer es una de las principales causas de mortalidad. En México, ocupa el tercer lugar con 128,000 casos en 2012. Aunado a ello, los tratamientos antineoplásicos son invasivos, dolorosos y presentan múltiples efectos adversos, además de no ser siempre efectivos. Esto ha llevado a la búsqueda de nuevos fármacos, que puedan ayudar al tratamiento contra esta enfermedad. En estudios recientes se ha demostrado la actividad anticancerígena de compuestos derivados de azetidin-2-onas. Por lo tanto en este proyecto se planteó como objetivo evaluar el efecto celular y molecular de 16 compuestos derivados de 3-fenoxi y 3-metoxi-*N*-(metoxi-fenil)-azetidin-2-onas sobre las líneas celulares SiHa, Chang y B16F10. La evaluación de la actividad citotóxica *in vitro*, se realizó en células SiHa, Chang y B16F10, a través de la técnica de WST-1, donde se determinó el porcentaje de viabilidad celular a diferentes concentraciones: 10, 1, 0.1 y 0.01 μM de cada uno de los compuestos en estudio. Con los resultados de viabilidad se calculó el porcentaje de citotoxicidad, y se determinó la concentración inhibitoria media (CI_{50}) del crecimiento celular de cada uno de los compuestos. Se evaluó la actividad de Caspasa-3 mediante un ensayo de ELISA para determinar la presencia de apoptosis inducida por

los compuestos. Finalmente para complementar el estudio a nivel molecular, se analizaron los patrones de expresión genética inducidos por el compuesto C-089 en células B16F10, a través de un microarreglo de DNA de ratón y se realizó un ensayo *in silico* de Docking para evaluar las posibles interacciones moleculares de los compuestos con blancos terapéuticos conocidos.

Contribuciones y Conclusiones. Se observó que el compuesto C-089 presentó una actividad citotóxica en células SiHa con un valor de $CI_{50} = 0.07262 \mu M$ y en células murínicas B16F10 con un valor de $CI_{50} = 1.214 \mu M$; sin embargo, en células Chang el valor de CI_{50} fue $>10.00 \mu M$. Estos datos nos muestran una selectividad sobre las líneas celulares, la cual no está presente en el control Vincristina. Posteriormente, al realizar el ensayo de Caspasa-3, en células B16F10, se demostró que los compuestos derivados de azetidin-2-ona presentan una actividad apoptótica al igual que la podofilotoxina. Finalmente, Los resultados del análisis molecular por microarreglos y docking muestran que el compuesto C-089 está involucrado en la sobre expresión de genes específicos de la regulación del citoesqueleto y la apoptosis, encontrándose inhibidos algunos genes del ciclo celular.

En conclusión, el compuesto C-089 presentó la mayor selectividad hacia células neoplásicas, además de comprobar por la determinación de caspasa-3 que es inductor de la apoptosis. Se determinó a través de un análisis de la expresión génica que las vías metabólicas involucradas en la actividad biológica inducida por este compuesto son principalmente el ciclo celular, la apoptosis y el citoesqueleto. Y a través del ensayo de acoplamiento molecular se demostró una posible interacción con la β -Tubulina.

Firma del asesor:

Dr. Isaías Balderas Rentería

AGRADECIMIENTOS

A mi Dios por la familia que siempre ha estado conmigo en cada etapa de mi vida, mostrándome siempre su apoyo. Santos Olazarán, Hermelinda Santibáñez, Claudia y Atalía Olazarán Santibáñez.

A la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León por darme la oportunidad de adquirir nuevos conocimientos y sobre todo el mejorar como profesionista.

A el Consejo Nacional De Ciencia Y Tecnología por gran apoyo económico a través de la beca nacional de posgrado.

A la Universidad Autónoma de Tamaulipas por su apoyo al proporcionar un complemento de beca para continuar desarrollándome como profesionista.

Al Dr. Isaías Balderas Rentería por haberme conducido a través de este nuevo mundo de conocimiento en el área científica, además mi más sincero agradecimiento por creer en mí.

Al comité tutorial Drs. Xristo Zárate Kalfópulos, Abraham García Zepeda, Víctor Manuel Rosas García por su apoyo incondicional y sus sabios consejos.

Al departamento de Microbiología de la Facultad de Biología UANL en especial a Dra. Jeannie Salinas y Dr. Ismael Malagón por mostrarme una salida ante un problema mayor con las líneas celulares.

Al Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y principalmente al Dr. Jorge Ramírez Salcedo y su equipo de trabajo QBP Lorena Chávez González, M. en I.I.B Simón Guzmán León, Dr José Luis Santillán Torres, por haberme apoyado con el desarrollo del Microarreglo de DNA

Al Centro de Biotecnología genómica del IPNA los Drs. Gildardo Rivera Sánchez, Aldo Segura Cabreray Carlos García por su hospitalidad y enseñanzas en el área de Bioinformática y Química computacional.

A los compañer@s del Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica; Irma Vega, Silvia Aldana, Marisol Guzmán, Teresa, Ivette Aldama, Sandra Cortinas, Ana Vaquero, Zulma, Juan-Jo, Guillermo Ramírez, Enrique Cantú, Héctor Ramírez, Eder Arredondo, Raúl Reyna y Mohamed Ramadan.

A los compañer@s del Laboratorio de Productos Naturales Adriana Romo, Adriana Hernández, Aldo Clemente, Dra. Patricia Esquivel y Dra. María del Rayo Camacho.

Al Dr Juan Manuel Favela Hernández (Sensei) escucha ganda... aprovecha las oportunidades de la vida.

A mis Amig@s Emily Caldera, Martha Ibarra, Perla Legarreta, Elizabeth Ortiz, Lizeth Morales, Lakzmi, Argelia Camacho, Laura Pérez, Paola Mendoza, Lázaro Camargo, Ricardo González, Josué Flores, Omar Morales, Daniel Ibarra, Rubén Huston, Federico Silva, Mario Rodríguez y Noah Sandoval.

DEDICATORIA

*A mi familia, Santos Olazarán, Hermelinda Santibáñez, Atalia y Claudia Olazarán
Santibáñez*

*A las personas que creen en mí y me aconsejaron a no rendirme ante los problemas de la vida Mirna
Pano, Julio Sánchez, Isatas Balderas y Teresa Guzmán*

*A ti que eres la razón por la cual me esfuerzo cada día para ser mejor y muy pronto poder ofrecerte lo
mejor. Ya por ti Amor.*

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA.....	v
TABLA DE CONTENIDO.....	vi
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
NOMENCLATURA	xii
CAPÍTULO 1	1
1.1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1.1.- Epidemiología y definición del cáncer	1
1.1.2.- Factores desencadenantes del cáncer	2
1.1.3.- Tratamiento contra el cáncer.....	2
1.1.4.- Mecanismos de acción de los fármacos antineoplásicos	3
1.2.- ANTECEDENTES	6
CAPITULO 2	13
2.1.- JUSTIFICACIÓN.....	13
2.2.- HIPÓTESIS.....	14
2.3.- OBJETIVOS	14
2.3.1.- Objetivo general.....	14
2.3.2.- Objetivos específicos	14
CAPÍTULO 3	15
3.1.-MATERIALES	15
3.1.1.- Equipos y su ubicación.	15
3.1.2.- Reactivos y compuestos.....	15

3.2.- METODOLOGÍA.....	19
3.2.1.- PROLIFERACIÓN Y CONSERVACIÓN DE CÉLULAS CHANG, SIHA Y B16F10	19
3.2.1.1.- Descongelamiento de las líneas celulares Chang, SiHa y B16F10	19
3.2.1.2.- Procedimiento de proliferación celular en las células Chang, SiHa y B16F10	19
3.2.1.3.- Crio-conservación de las líneas celulares Chang, SiHa y B16F10	20
3.2.2.- EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LOS DERIVADOS DE AZETIDIN-2-ONA.....	21
3.2.2.1.- Procedimiento de la técnica de WST-1 para la determinación de la viabilidad celular.....	21
3.2.3.- DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE APOPTOSIS POR LA TÉCNICA DE CASPASA-3	23
3.2.4.- ANÁLISIS DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN GÉNICA	24
3.2.4.1.- Extracción de ARN	24
3.2.4.2.- Marcado del ARN	25
3.2.4.3.- Hibridación de los Microarreglos.....	25
3.2.4.4.- Lectura de microarreglos.....	26
3.2.4.5.- Análisis Bioinformático.	26
3.2.5.- ANÁLISIS DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR.....	26
3.2.6.- SEGURIDAD EN EL LABORATORIO Y DISPOSICIÓN DE LOS RESIDUOS	27
CAPÍTULO 4	29
4.- RESULTADOS	29
4.1.- ENSAYOS DE VIABILIDAD, CITOTOXICIDAD Y ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA .	29
4.1.1.- Evaluación de la actividad citotóxica en células Chang	29
4.1.2.- Evaluación de la actividad citotóxica en células SiHa.....	31
4.1.3.- Evaluación de la actividad citotóxica en células B16F10.....	31
4.1.4.- Concentración inhibitoria media de los compuestos derivados de azetidin-2-ona, en las líneas celulares Chang, SiHa y B16F10	33

4.2.- DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD APOPTÓTICA MEDIANTE EL ENSAYO DE CASPASA-3	34
4.3.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA A TRAVÉS DE MICROARREGLOS DE ADN ..	36
4.3.1.- Condiciones de las muestras en estudio	36
4.3.2.- Extracción del ARN	37
4.3.3.- Lectura y cuantificación del microarreglo	37
4.3.4.- Análisis bioinformático	39
4.4.- ANÁLISIS DEL ACOPLAMIENTO MOLECULAR	43
CAPITULO 5	47
5.- DISCUSIÓN	47
CAPITULO 6	51
6.1.- CONCLUSIONES	51
6.2.- PERSPECTIVAS.....	53
6.3.- REFERENCIAS.....	54
6.4.- RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO	59

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Compuestos derivados de 3-fenoxi y 3-metoxi <i>N</i> -(metoxi-fenil)-azetidin-2-onas para evaluación celular y molecular.....	16
Tabla 2. Promedio y desviación estándar del porcentaje de actividad citotóxica en células Chang. Se probaron concentraciones de 10, 1, 0.1 y 0.01 μ M de los 16 compuestos derivados de azetidin-2-ona y la Vincristina.....	30
Tabla 3. Promedio y desviación estándar del porcentaje de actividad citotóxica en células SiHa. Se probaron concentraciones de 10, 1, 0.1 y 0.01 μ M de 8 compuestos derivados de azetidin-2-ona y la Vincristina.....	31
Tabla 4. Promedio y desviación estándar del porcentaje de actividad citotóxica en células B16F10. Se probaron concentraciones de 10, 1, 0.1 y 0.01 μ M de los 16 compuestos derivados de azetidin-2-ona y la Vincristina.....	32
Tabla 5. Valores de Concentración Inhibitoria Media (CI ₅₀) de los 16 compuestos derivados de azetidin-2-ona en las tres líneas celulares Chang, SiHa y B16F10.....	33
Tabla 6. Actividad Apoptótica de los compuestos cabeza de serie versus la podofilotoxina.....	35
Tabla 7.- Lista de genes sobreexpresados en la vía de apoptosis	40
Tabla 8.- Lista de genes sobreexpresados en la vía de citoesqueleto	41
Tabla 9.- Lista de genes inhibidos en la vía del ciclo celular.	43
Tabla 10.- Energía de acoplamiento molecular (docking) de los compuestos derivados de azetidin-2-ona en el sitio de unión de la β -tubulina.....	45
Tabla 11.- Actividad antiproliferativa dramáticamente alterada al cambiar un hidroxilo por un metoxilo.	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de los compuestos 1 y 2 con actividad sobre líneas celulares de leucemia y carcinoma de colon	7
Figura 2. Estructura de los compuestos 3 y 4 con actividad antitumoral.	8
Figura 3. Síntesis de azetidin-2-onas a partir de cetenas quirales de los carbohidratos	9
Figura 4. Estructura de los compuesto 6 y 7 con actividad antitumoral	9
Figura 5. Estructura del compuesto 8 con actividad en la línea celular MCF-7	10
Figura 6. Estructura del compuesto 9 con actividad en la línea celular MCF-7	11
Figura 7. Síntesis de derivados de azetidin-2-ona a través de la reacción de Staudinger	12
Figura 8. Fórmulas para determinar el porcentaje de viabilidad y citotoxicidad.....	22
Figura 9. Anillo de azetidin-2-ona y sus radicales.....	30
Figura 10. Curva de calibración para determinar la concentración de proteínas a través del método de Bradford.	34
Figura 11. La actividad de caspasa-3.....	35
Figura 12. Células B16F10 en condiciones de apoptosis con la podofilotoxina y C-089..	36
Figura 13. Electroforesis en gel agarosa al 1% de ARN total	37
Figura 14. Una parte del microarreglo de ADN de ratón	38
Figura 15. Valores de Z-score para el análisis de microarreglos del compuesto C-089 sobre la línea celular B16H10	39
Figura 16.- Diagrama arrojado por DAVID de genes sobre-expresados que se encuentran involucrados en la apoptosis.....	40
Figura 17.- Diagrama arrojado por DAVID de genes sobre-expresados que se encuentran involucrados en la regulación del citoesqueleto	41

Figura 18.- Diagrama arrojado por DAVID de genes inhibidos que se encuentran involucrados en la división celular.....	42
Figura 19.- Secuencia de aminoácidos de la β -tubulina humana.....	44
Figura 20.- Molécula de β -tubulina diseñada.	44
Figura 21.- Interacciones moleculares con la β -tubulina humana.	46
Figura 22.- Estructuras de los compuestos 12 reportados por Carr y colaboradores.....	48

NOMENCLATURA

Símbolo o abreviatura	Significado
°C	Grados Celsius
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar
µMn	Nanomolar
Abs	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BRO	Melanoma Humano
CI₅₀	Concentración Inhibitoria media
CO₂	Dióxido de carbono
Conc	Concentración
CPT-11	Carcinoma de colon
HL-60	Leucemia
Hr	Horas
HT-29	Carcinoma de colon
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
K-562	Carcinoma de pulmon
MDA-MB-231	Carcinoma de mama
Min	Minutos
MTX	Metrotexato
OMS	Organización mundial de la salud

PASS	Programa de predicción de espectro de la actividad de sustancias
PBS	Buffer de Fosfatos salinos
PC-3	Carcinoma prostático
REA	Relación estructura-actividad
RMN H	Resonancia Magnética Nuclear de un protón
SFB	Suero Fetal Bovino
SKVO-3	Carcinoma de ovario
SSA	Secretaria de salud
T	Temperatura
DMSO	Dimetilsulfoxido
MEM	Medio enriquecido mínimo

CAPÍTULO 1

1.1.- INTRODUCCIÓN

1.1.1.- Epidemiología y definición del cáncer

A nivel mundial el cáncer es una de las principales causa de mortalidad. Se le atribuyen 7.6 millones de defunciones mundiales (aprox. 13%) ocurridas en el 2008 de acuerdo con la organización mundial de la salud (OMS).¹ Los principales tipos de cáncer son: pulmonar, gástrico, hepático, colorrectal y mamario. Aproximadamente el 70% de las defunciones debidas a cáncer se registraron en países de ingresos bajos y medianos. Se prevé que el número de defunciones anuales mundiales por cáncer seguirá aumentando y llegará a unos 11 millones en 2030.¹ Además en México, la Secretaría de Salud (SSA) reportó que el 8.7% de los egresos hospitalarios por cáncer fueron debido a la leucemia. En los hombres, el cáncer más frecuente es la leucemia (15.1%), mientras que en las mujeres es el cáncer de mama (8.4 %)². La incidencia de cáncer de mama fue de 14.63 por cada 100 mil mujeres mayores de 14 años. Entre las mujeres de 60 años y mayores, el cáncer cervicouterino tiene una tasa de mortalidad de 41.88 por cada 100 mil mujeres.²

El cáncer es un crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos, que puede originarse a partir de cualquier tipo de célula, en cualquier tejido corporal.³ Existen varios cientos de formas distintas, siendo tres los principales tipos: los sarcomas, que proceden del tejido conectivo como huesos, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo; los carcinomas, procedentes de tejidos epiteliales como la piel o los epitelios que tapizan las cavidades y órganos corporales así como de los tejidos glandulares de la mama y

próstata; y las leucemias y linfomas, que abarcan los cánceres de los tejidos formadores de las células sanguíneas, producen inflamación de los ganglios linfáticos, invasión del bazo y médula ósea y sobreproducción de células blancas inmaduras. De ellos, los carcinomas son considerados los cánceres más frecuentes, pues constituyen un 90% del total de los tres tipos.³

1.1.2.- Factores desencadenantes del cáncer

Ciertos factores son capaces de originar cáncer en un porcentaje de los individuos expuestos a ellos. Entre éstos se encuentran la herencia, los productos químicos, las radiaciones ionizantes, las infecciones por virus y traumas. Distintos grupos de investigación estudian los procesos en que estos diferentes factores pueden interactuar de una manera multifactorial y secuencial para producir tumores malignos. El cáncer es, en esencia, un evento genético. Las alteraciones genéticas pueden ser heredadas, o producidas en alguna célula por un virus o por una lesión provocada de manera externa.⁴

1.1.3.- Tratamiento contra el cáncer

Existen diferentes tratamientos para el cáncer siendo los principales la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. También existen terapias auxiliares o alternativas como la terapia fotodinámica e inmunoterapia. Los tratamientos para el cáncer tratan de cumplir con el objetivo de mejorar la calidad de vida a través de la inhibición de la proliferación celular cancerígena. Para un mejor tratamiento es necesario un diagnóstico exacto de las líneas celulares afectadas.⁴⁻⁶

El término quimioterapia suele reservarse a los fármacos empleados en el tratamiento de las enfermedades neoplásicas, que tienen como función el impedir la

reproducción de las células cancerosas. Dichos fármacos se denominan medicamentos citostáticos o citotóxicos. El mecanismo de acción es causar una alteración celular ya sea en la síntesis de ácidos nucleicos, división celular o síntesis de proteínas. El efecto de los diferentes citostáticos varía según la dosis a la que se administre. Por tanto, la quimioterapia es la utilización de diversos fármacos que tienen la propiedad de interferir con el ciclo celular, ocasionando la destrucción de células. La terapia antineoplásica tiene una gran limitación, que es su escasa especificidad, y debido a su inespecificidad afecta a otras células y tejidos normales del organismo, sobre todo si se encuentran en división activa.⁴⁻⁶

Actualmente, existen más de 100 medicamentos diferentes para combatir la enfermedad y prevenir el crecimiento, multiplicación y la diseminación de células malignas. La terapia consiste en la administración de fármacos citotóxicos, normalmente por vía intravenosa, capaces de impedir la proliferación y crecimiento de células malignas, destruyendo el tumor o reduciendo la masa tumoral. Los fármacos antineoplásicos tienen acción directa sobre diversas partes vitales de la célula, paralizando la división celular.⁴⁻⁶

1.1.4.- Mecanismos de acción de los fármacos antineoplásicos

Los mecanismos de acción de cada uno de los grupos de fármacos anticancerosos son los siguientes:

- Fármacos antimetabolitos: Interfieren en los pasos de la síntesis del ADN o ARN.

En este grupo se encuentra por ejemplo el metotrexato (MTX), inhibidor de la dihidrofolato-reductasa, que es una enzima metabólica limitante al participar en la transferencia de grupos monocarbonados en muchas reacciones esenciales para la

célula como la síntesis de aminoácidos y bases nitrogenadas. Otro ejemplo son los análogos de bases pirimidínicas, como el 5-fluorouracilo (5-FU) que añade un átomo de flúor en posición cinco, en lugar del hidrógeno, lo cual lesiona las células por dos mecanismos: inhibiendo la timidilato-sintetasa e incorporándose a la molécula de ARN.⁶

- **Inhibidores de las Topoisomerasas:** Las topoisomerasas del ADN son enzimas nucleares que controlan, mantienen y modifican la estructura y la topología del ADN durante los procesos de replicación y transcripción del material genético. Los inhibidores ejercen su acción a este nivel estimulando y estabilizando los complejos ADN-enzima, lo que provoca la escisión mantenida de la cadena de ADN y la consecuente pérdida de su función. Ejemplos de este tipo de compuestos son el irinotecán(CPT-11, Campto) y el topotecán(Hycamtin). Una reacción adversa en este tipo de tratamiento es la leucopenia.⁶
- **Agentes Alquilantes:** Su acción citotóxica se manifiesta mediante la formación de enlaces covalentes entre sus grupos alquilo y diversas moléculas nucleofílicas presentes en las células. Actúan preferentemente a nivel de las bases nitrogenadas del ADN. También pueden reaccionar con los grupos fosfato y alquilar bases del ARN. Las mostazas nitrogenadas como ciclofosfamida (Genoxal) e ifosfamida (Tronoxal) son agentes alquilantes bifuncionales. La toxicidad más frecuente es la mielodepresión.⁶

- **Antibióticos Antitumorales:** En su mecanismo de acción destaca su capacidad para intercalarse entre los pares de bases adyacentes de ADN y fijarse con intensidad. También son capaces de inhibir la topoisomerasa II. Un ejemplo de ellos es la doxorubicina (Adriamicina), la cual forma radicales libres que pueden afectar al ADN, alterar la membrana, inhibir la fosforilación oxidativa de las mitocondrias e inhibir diversas enzimas relacionadas con el ADN.⁶
- **Fijadores a la Tubulina:** El paclitaxel (Taxol) es el producto activo del *Taxus brevifolia*. El cual se une de manera reversible a la subunidad beta de la tubulina, favoreciendo la polimerización en microtúbulos. El taxol es activo sobre tumores sólidos frecuentemente resistentes a otros fármacos. Produce leucopenia o neutropenia.⁶

En estudios recientes se ha demostrado la actividad anticancerígena de nuevos derivados de azetidina-2-onas también llamadas anillos β -Lactámicos, que son moléculas heterocíclicas compuestas por tres átomos de carbono y un átomo de nitrógeno. Estos compuestos se han probado sobre diferentes líneas celulares tumorales, logrando una mayor especificidad y citotoxicidad, en comparación a los medicamentos existentes. Actualmente, esta alternativa terapéutica se encuentra en la etapa preclínica para determinar su efectividad, presentando así una nueva opción en la investigación del tratamiento frente al cáncer.⁷⁻¹⁸

1.2.- ANTECEDENTES

Banik I. y cols. (2003) llevaron a cabo la síntesis estereoselectiva de nuevos derivados de azetidin-2-onas con iminaspoliaromáticas, lo anterior como una propuesta de nuevos agentes contra el cáncer, empleando la reacción de Staudinger. El estudio de relación estructura-actividad (SAR, por sus siglas en inglés), reveló que los compuestos 1-*N*-crisenil y 1-*N*-fenantrenil 3-acetoxi-4-aryl-azetidin-2-onas ver Figura 1 (**1**, **2**) tienen actividad potente sobre líneas celulares cancerígenas, donde mencionan que la presencia del grupo acetoxi en posición 3 del anillo de azetidin-2-onas demostró ser esencial para ejercer una actividad sobre las líneas celulares cancerígenas.⁸

Posteriormente, BanikBK. y cols. (2004) realizaron estudios del mecanismo de acción de derivados de azetidin-2-onas, evaluando ensayos biológicos de apoptosis, mutagenicidad, interacción con las topoisomerasas y actividad en el ciclo celular. El estudio sobre la inhibición del crecimiento celular, logró determinar que el compuesto **1** presentó actividad anticancerígena selectiva sobre dos líneas celulares tumorales, leucemia HL-60 (CI₅₀ = 5.21 μM) y carcinoma de colon HT-29 (CI₅₀ = 10.49 μM). Además, el compuesto **2**, también presentó actividad sobre la leucemia HL-60 (CI₅₀ = 3.64 μM) y HT-29 (CI₅₀ = 5.26 μM) (Figura 1). En el análisis de actividad biológica se logró determinar un bloqueo de la fase G₂ del ciclo celular. Asimismo, se determinó que los compuestos no inhiben a las enzimas topoisomerasas; sin embargo, no se logró establecer el mecanismo de acción de los compuestos.⁹

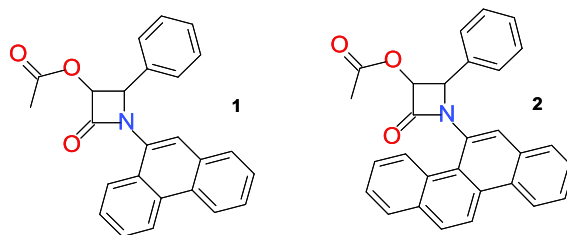


Figura 1. Estructura de los compuestos 1 y 2 con actividad sobre líneas celulares de leucemia y carcinoma de colon

Más adelante, en el 2005, el mismo grupo de investigación realizó la síntesis estereocontrolada de nuevos derivados de azetidin-2-onas, usando de nuevo la reacción de Staudinger. La formación de enantiómeros en configuración *trans* de azetidin-2-onas se explicó a través de la isomerización de los enolatos formados durante la reacción de cloruro de ácido con iminas poli aromáticas en presencia de trietilamina. Las azetidin-2-onas mostraron ser enantiómeros distintos debido al pH, al presentar una constante de acoplamiento característica de la configuración *trans* ($J = 2 \text{ Hz}$).¹⁰

Jarrahpour A. y cols. (2007) realizaron la síntesis de nuevos derivados de *N*-(4-etoxifenil) azetidin-2-onas con una desprotección oxidativa en nitrato de amonio cérico. Realizaron la síntesis de iminas aromáticas por la metodología de adición cetona-amina obteniendo resultados con un 44% de rendimiento. En la síntesis de azetidin-2-onas por la reacción de Staudinger obtuvieron resultados de un 81% de rendimiento. Durante la metodología se realizó la comparación de varios métodos con diferentes catalizadores, condiciones, solventes y tiempos de reacción, descubriendo que en condiciones de trietilamina /diclorometano seco a -10°C se obtenían los enantiómeros de azetidin-2-onas con la configuración *trans*.¹¹

Frezza y cols. (2008) llevaron a cabo el desarrollo de agentes antitumorales, que preferentemente pudieran tener una actividad selectiva sobre las células malignas, con un nivel de toxicidad comparable al de los controles utilizados. En este estudio determinaron que ciertos derivados de *N*-aquiltiolato-azetidin-2-onas pueden dañar el ADN, son inductores de la apoptosis en distintas líneas celulares tumorales y presentan menor efecto en células no transformadas; descubriendo dos análogos de azetidin-2-onas, **3** y **4** (Figura 2), ambos potentes inductores de la apoptosis. Además, el compuesto **3** mostró una actividad biológica *in vitro* mayor a **4**, debido a las modificaciones estructurales hechas en las posiciones N₁ y C₃ del anillo de azetidin-2-ona. Por otra parte, los derivados de azetidin-2-onas fueron capaces de inhibir el crecimiento del tumor en ratones, teniendo xenoinjertos de cáncer de mama de la línea celular MDA-MB-231, esto asociado con la inducción de daño en el ADN y la apoptosis en los tejidos tumorales. Los resultados muestran a estas azetidin-2-onas nuevas como potenciales agentes antitumorales.¹²

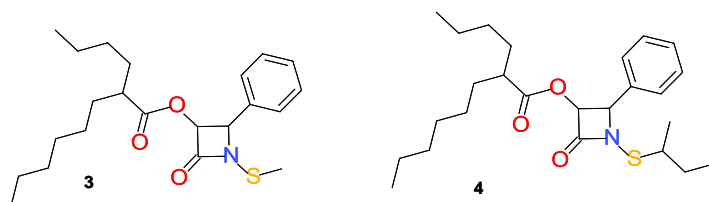


Figura 2. Estructura de los compuestos 3 y 4 con actividad antitumoral.

Nuevamente, Banik BK y cols. en 2010 realizaron la síntesis asimétrica de nuevos derivados de azetidin-2-onas con actividad frente al cáncer, a través de la reacción de Staudinger: utilizado cetenasquirales de los carbohidratos (Figura 3). Los estudios de citotoxicidad presentan que el compuesto **5** tiene una inhibición celular en 5 de 7 líneas celulares con actividad superior a la del cisplatino, los resultados fueron: BRO, 6.1 μ M.;

MDA-MB-231, 0.8 μ M.; SKVO-3, 6.8 μ M.; PC-3, 1.4 μ M.; HL-60, 0.7 μ M.; K-562, 1.1 μ M y HT-29, 0.7 μ M.¹³

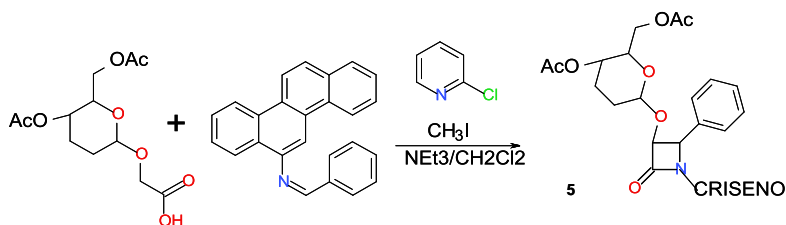


Figura 3. Síntesis de azetidin-2-onas a partir de cetenasquiraes de los carbohidratos

CarrM y cols. (2010) llevaron a cabo la síntesis y estudio de la relación estructura-actividad de una serie de análogos de combretastatina que contienen 1,4-diaril-azetidin-2-onas. Los compuestos más potentes fueron el **6** y **7** (Figura 4) con actividad antiproliferativa en concentraciones nanomolares cuando se evaluaron contra líneas celulares humanas de cáncer de mama, MCF-7 y MDA-MB-231. El compuesto **6** ejerció efectos antimitóticos a través de la inhibición de la polimerización de tubulina posterior a la fase G₂ de la mitosis, causando la detención del ciclo celular en las células de cáncer de mama, con una actividad similar a la del control combretastatina A-4.¹⁴

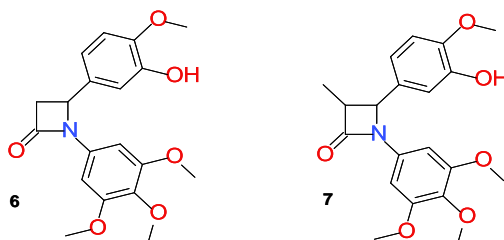


Figura 4. Estructura de los compuesto 6 y 7 con actividad antitumoral

O'Boyle y cols. (2010) llevaron a cabo la síntesis y ensayos de la actividad antiproliferativa de una serie de análogos de combretastatina A-4, los cuales contienen el fragmento 1,4-diarilazetidin-2-ona. Dichos análogos mostraron una potente actividad a concentraciones nanomolares en líneas celulares humanas MCF-7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama, donde muestran una inhibición *in vitro* de la polimerización de la tubulina, sin causar citotoxicidad significativa en condiciones normales de células epiteliales de seno. El compuesto 4-(3-hidroxi-4-metoxiaril) sustituido **8** (Figura 5), mostró la actividad antiproliferativa más potente de la serie. Este compuesto en particular, mostró actividad a una concentración subnanomolar en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama ($CI_{50} = 0.8 \text{ nM}$). Estos compuestos fueron identificados como precursores potencialmente útiles para el desarrollo de agentes antitumorales que tengan como objetivo la inhibición de la polimerización de la tubulina.¹⁵

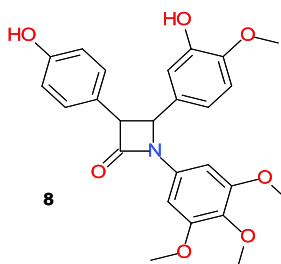


Figura 5. Estructura del compuesto 8 con actividad en la línea celular MCF-7

O'Boyle y cols. (2011) describieron la relación estructura-actividad antiproliferativa de las azetidin-2-onas con modificaciones en la posición 4 del anillo. La síntesis de estas series de compuestos se logró utilizando las reacciones de Staudinger y Reformatsky. La actividad antiproliferativa fue probada en células MCF-7 donde el compuesto sustituido 4-(4-etoxi)fenil **9** (Figura 6), mostró la actividad más potente con un

valor de CI_{50} de 0.22 μ M. El mecanismo de acción demostrado fue por inhibición de la polimerización de la tubulina. Este compuesto condujo a la retención de la línea celular MCF-7 en la fase G_2/M del ciclo celular e inducción de apoptosis; aunado a ello, se demostró la interrupción de la mitosis por el compuesto **9** en células de cáncer de mama, al confirmarse la formación de células gigantes multinucleadas.¹⁶

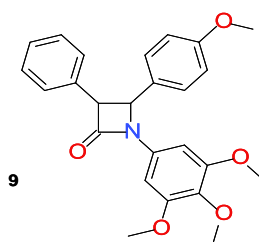


Figura 6. Estructura del compuesto 9 con actividad en la línea celular MCF-7

Olazarán y cols. (2011) llevaron a cabo la síntesis y evaluación *in silico* de la actividad biológica de nuevos derivados de 3-fenoxi-*N*-(metoxi-fenil)-azetidín-2-ona con potencial actividad anticancerígena, logrando la síntesis, a través de la reacción de Staudinger, de seis nuevos derivados con buenos rendimientos de un 65 a 80% (Figura 7 y Tabla 1). Todos los compuestos fueron confirmados por espectroscopia de Infrarrojo (IR) y Resonancia Magnética Nuclear de un protón (RMN 1H). La evaluación *in silico* de la actividad biológica de los compuestos por medio del programa de predicción de Estructura-Actividad(PASS)¹⁷, mostró que los derivados de azetidín-2-onas resultaron ser potenciales agentes anticancerígenos.¹⁸

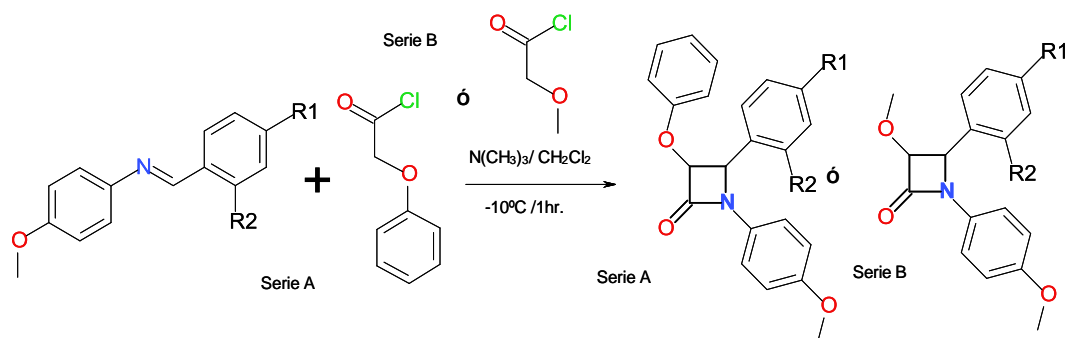


Figura 7. Síntesis de derivados de azetidin-2-ona a través de la reacción de Staudinger

CAPITULO 2

2.1.- JUSTIFICACIÓN

El cáncer presenta una alta incidencia de mortalidad ocupando una de las principales causas de muerte a nivel mundial y tercer lugar a nivel nacional. Aunado a ello, los tratamientos existentes suelen ser invasivos, dolorosos y presentar múltiples efectos adversos además de no ser siempre efectivos.

Esto ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas farmacéuticas que puedan ayudar al tratamiento de esta enfermedad, presentándose los compuestos derivados de azetidin-2-onas como candidatos prometedores y viables debido a que evidencian una potente actividad citotóxica, tal como lo describe Miriam Carr en 2009, donde demuestra que derivados de azetidin-2-ona presentan una actividad sobre la línea celular MCF-7 (cáncer de mama) alcanzado un CI_{50} de $0.8nM^{14}$.

Además del efecto citotóxico, es deseable conocer otros procesos celulares específicos en los que se ve involucrado un potencial candidato anticancerígeno, de ahí que sea necesario poder realizar otros ensayos como: A) la elucidación del mecanismo de acción que está llevando a la muerte celular, B) una profunda exploración en el campo de la identificación de los genes involucrados en las vías metabólicas de la acción de derivados de azetidin-2-ona en una línea celular cancerígena y C) Una exploración en el conocimiento de las interacciones moleculares del receptor con los compuestos derivados de azetidin-2-ona en la actividad anticancerígena.

2.2.- HIPÓTESIS

Los derivados de 3-fenoxi y 3-metoxi azetidin-2-onas presentan un efecto antiproliferativo mayor que la Vincristina y una alteración en el patrón de expresión génica sobre líneas celulares cancerígenas, relacionada al metabolismo de los microtúbulos.

2.3.- OBJETIVOS

2.3.1.- Objetivo general

Evaluar el efecto celular y molecular de 16 derivados de 3-fenoxi- y 3-metoxi-*N*-(metoxifenil)-azetidin-2-onas sobre líneas celulares cancerígenas.

2.3.2.- Objetivos específicos

- Evaluar la actividad anticancerígena *in vitro* de 16 derivados de azetidin-2-ona en líneas cancerígenas SiHa y B16F10.
- Evaluar la actividad citotóxica *in vitro* de 16 derivados de azetidin-2-ona en la línea celular Chang.
- Evaluar la actividad apoptótica de 3 derivados de azetidin-2-ona más significativos en la actividad citotóxica, en líneas celulares B16F10.
- Determinar los patrones de expresión génica inducidos por la molécula más activa en la línea celular B16F10.
- Determinar el acoplamiento molecular de los ligandos (Docking).

CAPÍTULO 3

3.1.-MATERIALES

3.1.1.- Equipos y su ubicación.

Los equipos se encuentran en el Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica;

Módulos para cultivo celular (Incubadoras con ambiente al 5% de CO₂, campana de bioseguridad nivel II, campana de cultivo microbiano, espectrofotómetro UV-VIS, planchas con agitación, esterilizador eléctrico, centrífuga, microscopio óptico con cámara, lector para ensayos inmunoenzimáticos, micromanipuladores y unidades de enfriamiento). Módulo para extracción, análisis y manipulación de ácidos nucleicos (campana de extracción, microcentrífugas, cámaras de electroforesis vertical y horizontal, fuentes de poder, vórtex, termocicladores, fotodocumentador). Para los análisis moleculares se utilizó un microarreglo de DNA de ratón del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y diversos programas más adelante descritos, para el estudio del acoplamiento molecular.

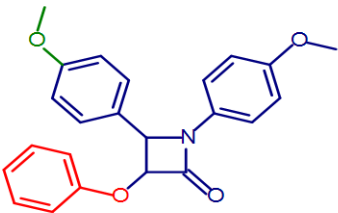
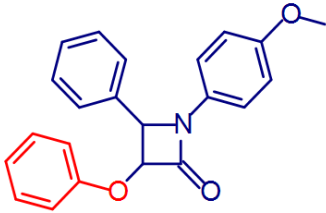
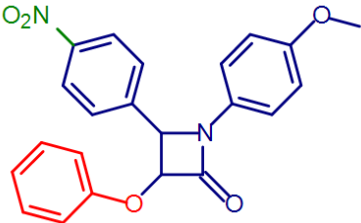
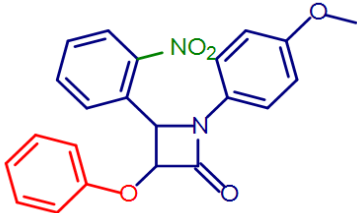
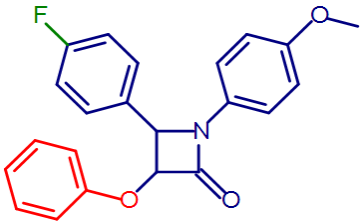
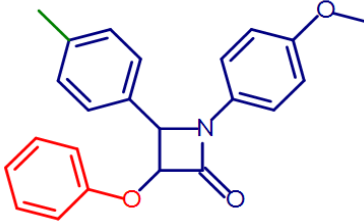
3.1.2.- Reactivos y compuestos

Para el cultivo celular se utilizó: Medio Esencial Mínimo (MEM), suero fetal bovino (SFB), buffer de fosfatos salino (PBS, por sus siglas en inglés), antibiótico y tripsina y para los ensayos de la viabilidad y proliferación celular, el kit WST-1 de marca Roche. Además, en los ensayos de apoptosis se utilizó el kit para caspasa-3 de la marca Invitrogen.

Los compuestos a analizar fueron obtenidos a través de síntesis orgánica, y caracterizados por cromatografía de capa fina (CCF), espectroscopía infrarrojo (IR), y resonancia

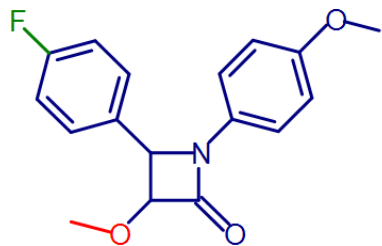
magnética nuclear (RMN H), por el grupo de investigación del Dr. Rivera del Instituto Politécnico Nacional.¹⁹

Tabla 1. Compuestos derivados de 3-fenoxi y 3-metoxi *N*-(metoxi-fenil)-azetidin-2-onas para evaluación celular y molecular.

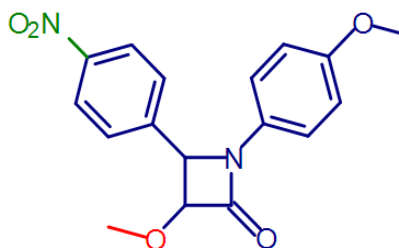
Compuestos de la serie A (3-fenoxi-azetidin-2-ona)	
<p>C-081</p> 	<p>C-082</p> 
<p>C-083</p> 	<p>C-084</p> 
<p>C-085</p> 	<p>C-089</p> 

Compuestos de la serie B (3-metoxi-azetidin-2-ona)

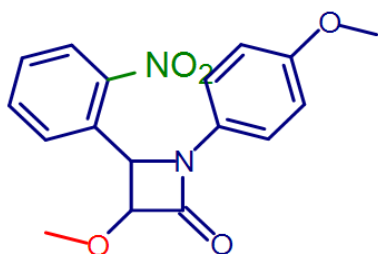
C-095



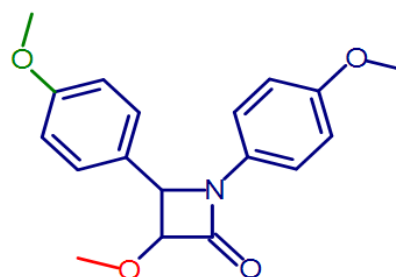
C-096



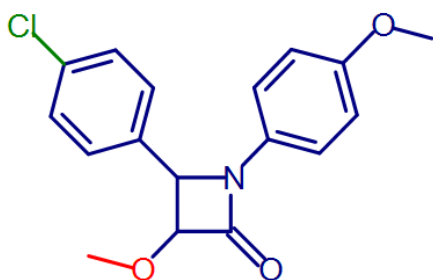
C-097



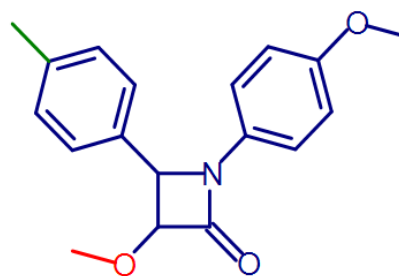
C-098



C-099

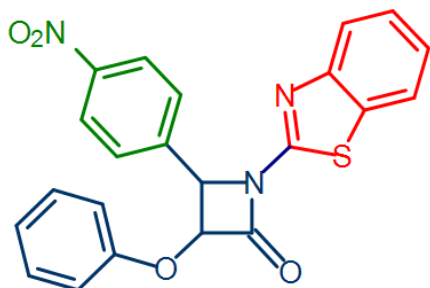


C-100

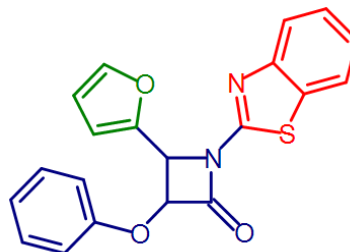


Compuestos de la serie C (*N*-bensotiazol-azetidin-2-ona)

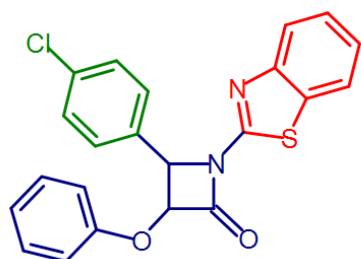
C-128



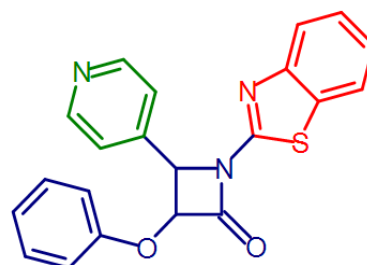
C-129



C-130



C-131



3.2.- METODOLOGÍA

3.2.1.- PROLIFERACIÓN Y CONSERVACIÓN DE CÉLULAS CHANG, SIHA Y B16F10

3.2.1.1.- Descongelamiento de las líneas celulares Chang, SiHa y B16F10

Para el descongelamiento de las líneas celulares se siguió paso a paso los protocolos establecidos para ello, en donde primeramente se realiza el descongelamiento del vial (eppendorf con células) en un baño de agua a 37°C, para reducir la posibilidad de contaminación se mantiene la tapa fuera del agua. La descongelación debe ser rápida y no debe de tardar más de un minuto en baño maría. Posteriormente se descontamina por inmersión o aspersión de etanol al 70%. Todas las operaciones deben llevarse a cabo bajo condiciones asépticas estrictas. Luego se resuspende el sedimento celular con el medio MEM y se distribuye en una caja de cultivo celular de 25 cm². Es importante remarcar que, antes de la adición del medio a la caja de cultivo, el recipiente que contiene el medio MEM se coloca en la incubadora durante al menos 15 minutos para permitir que el medio pueda llegar a su pH normal (7.0 a 7.6). Para finalizar el cultivo celular se incuba a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ durante hasta 48 horas.²⁰⁻²²

3.2.1.2.-Procedimiento de proliferación celular en las células Chang, SiHa y B16F10

Este procedimiento se realiza cuando las células llegan a un nivel de confluencia de aproximadamente el 80 % de proliferación, pero la renovación de medio MEM se realiza cada 2 o 3 días aunque la confluencia no sea mayor al 80 % de proliferación.²⁰⁻²²

Para la proliferación se requiere primeramente el retirar y desechar el medio de cultivo anterior (las células vivas permanecen adheridas a la caja de cultivo), y al ser

lavadas con una solución de PBS, las células muertas son eliminadas junto con otros residuos.²⁰⁻²²

Posteriormente se añaden 2,0 mL de tripsina-EDTA a la caja de cultivo y se incuba durante 2 minutos a 37°C en 5% de CO₂, lográndose observar en un microscopio invertido, cómo las células se despegan de la caja y empiezan a flotar. Se realiza la aspiración con una pipeta pasteur con mucho cuidado de no maltratar las células, se colocan en nuevos tubos eppendorf de 2 ml, en donde se realiza una centrifugación durante 5 min a 5000 rpm esto para formar una pastilla de células al fondo del tubo. Se retira la tripsina y se coloca medio nuevo MEM, (se realiza un conteo celular con una cámara de Neubauer). En donde se calcula y se realizan diluciones para sembrar en una nueva caja de cultivo celular aproximadamente 50,000 cel/mL. Se realiza la incubación a 37°C en un ambiente al 5 % de CO₂.²⁰⁻²²

3.2.1.3.-Crio-conservación de las líneas celulares Chang, SiHa y B16F10

Este procedimiento es fundamental para la conservación y almacenamiento de las diferentes líneas celulares Chang, SiHa y B16F10. El uso de Medio de crecimiento (MEM) con 5% de DMSO es crucial debido a que funciona como un crio-protector a las células.

Para ello es necesario primeramente retirar y desechar el medio anterior de cultivo, lavar con PBS para eliminar residuos y células muertas. Se añaden 2,0 mL de tripsina-EDTA a la caja de cultivo esto durante 5 min para lograr una completa disociación de las células, para posteriormente transferir las células a un tubo eppendorf de 2 ml. Se realiza la centrifugación durante 5 min a 5,000 rpm a una temperatura de 4°C. Posteriormente se cuantifica aproximadamente 500,000 células por vial al diluir en un mililitro de medio

MEM con 5 % de DMSO y se traspasa en el momento a nitrógeno líquido para su criopreservación. Así pueden ser transportadas y almacenadas en un congelador de menos 70°C durante el tiempo necesario. Para descongelar las células observar el procedimiento de descongelación anteriormente mencionado.²⁰⁻²²

3.2.2.- EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LOS DERIVADOS DE AZETIDIN-2-ONA

A partir de las líneas celulares Chang (hepatocitos), SiHa (cáncer de cérvix) y B16F10 (melanoma murino), fueron evaluadas la viabilidad, la citotoxicidad y la concentración inhibitoria media (CI₅₀) de los 16 derivados de azetidin-2-ona. A través de la técnica de WST-1.²³

3.2.2.1.- Procedimiento de la técnica de WST-1 para la determinación de la viabilidad celular

Se obtuvieron células disociadas que fueron resuspendidas en medio de cultivo MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino en placas de poliestireno de 96 pocillos a una densidad celular de aproximadamente 50,000 células por mililitro. Se incubaron durante 24 horas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ y se añadieron las concentraciones 10, 1, 0.1 y 0.01 µM de cada uno de los derivados de azetidin-2-ona en estudio, en un volumen total de 100 µL. Posteriormente se incubó por 24 horas a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂, para después reemplazar el medio viejo por 100 µL de medio MEM nuevo y se añadió 10 µL del reactivo WST-1 [2-(4 yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio]. Las células fueron incubadas por 2 horas a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂ y finalmente se midió la densidad óptica a 450nm con un lector para ensayos inmunoenzimáticos (ELISA, por sus siglas en inglés).²⁴

Con los valores de absorbancia obtenidos por el lector de ELISA de los compuestos en estudio a las diferentes concentraciones, y los controles, se logró determinar el porcentaje de viabilidad celular a través de la resta de la absorbancia del analito, a la absorbancia del control positivo (muerte celular al 100% con TritónX100 al 10%), entre la absorbancia del control negativo (células sin tratar en condiciones normales de viabilidad), el valor obtenido se multiplica por 100 (Figura 8). Obteniendo el porcentaje de viabilidad, el cual es inversamente proporcional a la citotoxicidad. El porcentaje de citotoxicidad es igual a la resta del 100 % menos el porcentaje de viabilidad (Figura 8). El porcentaje de citotoxicidad es la muerte celular provocada por los compuestos y el medicamento control vincristina. Con el porcentaje de citotoxicidad se logra determinar la concentración inhibitoria media (CI₅₀), esto a través del programa estadístico GraphPadPrism 6 (mediante regresión lineal).²⁵

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{Abs. analito} - \text{Abs. control (+)}}{\text{Abs. control (-)}} \times 100$$

$$\% \text{ Citotoxicidad} = 100 \% - \% \text{ Viabilidad}$$

Figura 8. Fórmulas para determinar el porcentaje de viabilidad y citotoxicidad

Con este valor y el referente el medicamento Vincristina[®], se logra comparar y concluir actividad citotóxica sobre las líneas celulares Chang, SiHa y B16F10.

3.2.3.- DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE APOPTOSIS POR LA TÉCNICA DE CASPASA-3

A partir de un cultivo de la línea celular B16F10 se obtuvieron células disociadas que fueron resuspendidas en medio de cultivo MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino en placas de poliestireno de 12 pozos a una densidad celular de aproximadamente $3-5 \times 10^6$ células por mililitro. Posteriormente, se incubaron las células durante 24 horas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ y se añadieron 100 µL con la CI₅₀ de la muestra a analizar, así como los controles. Después se incubaron por 24 horas a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂.²⁶

A continuación se resuspendieron las células y se añadieron 50 µL de reactivo de lisis celular, se incubó durante 10 minutos en hielo, posteriormente se centrifugó y se transfirió el sobrenadante (extracto de citosol). Se diluyó el extracto de citosol a una concentración de 50-200 µg por cada 50 µL de reactivo de lisis celular.

Se añadieron 50 µL de buffer de reacción 2X y 5 µL de tetrapéptido de p-nitroanilina (DEVD pNA). Se incubó a 37°C durante 2 horas (en oscuridad) y finalmente se midió la densidad óptica a 405 nm con un lector para ensayos inmunoenzimáticos (ELISA, por sus siglas en inglés). Con el valor calculado se determinó la actividad de apoptosis de los compuestos a analizar. Con este dato y el referente al del control positivo (podofilotoxina), se logró comparar y así concluir si los compuestos presentan actividad apoptótica sobre células cancerígenas.²⁶

3.2.4.-ANÁLISIS DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN GÉNICA

Los microarreglos de ADN en términos generales son empleados para detectar la expresión diferencial de genes en dos condiciones experimentales, terapéuticas o fisiológicas distintas. Las diferencias en el nivel de expresión de cada gen se determinan en función del número de copias de ARNm mensajeros existentes en las muestras. La versatilidad de esta técnica permite utilizarla en estudios de dosis-respuesta, para establecer perfiles de expresión diferencial de genes en condiciones experimentales distintas (enfermedades, tratamientos, etc.). Para el estudio genómico se utilizó la línea celular B16F10 y se les realizó una extracción de ARN, síntesis de ADN complementario y posteriormente la hibridación en los microarreglos.²⁷

3.2.4.1.- Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó a partir de una pastilla de células con aproximadamente 500,000 células, se añadió 500 µL de reactivo de trizol, se dejó reposar 2 min, se añadió 200 µL de cloroformo, se dejó reposar 3 min, se centrifugó por 8 min a 14,000 rpm, se separó la fase acuosa y se añadieron 500 µL de isopropanol, se centrifugó 10 min a 14,000 rpm, se lavó con 500 µL de etanol al 70%, se centrifugó 5 min a 8,000 rpm, y la pastilla formada se secó y fue resuspendido el RNA en 50 µL de agua DEPC.²⁸ Las muestras de ARN se corrieron en un gel de agarosa al 1%, con buffer tris-acetato de sodio-EDTA (TAE, en agua tratada con Dietilpirocarbonato) 1X en una cámara de electroforesis. Las muestras se corrieron por 30 minutos a 120 V, y las imágenes se almacenaron en un Fotodocumentador con el programa Gel Doc XR (BioRad). Para cuantificar las muestras, el análisis de densidad óptica (DO) $^{260}_{280}$ se realizó en un Biofotómetro (Eppendorf), para cada muestra se colocó 1 µL de ARN con 99 µL de Agua-

DEPC. Se consideró ARN de calidad si mantiene una relación de $DO^{260}/_{280}$ entre 1.8 - 2.0. Para la obtención de aminoalil-cADN, se utilizó el kit Chipshot de Promega, siguiendo el Protocolo Promega (Z3604).²⁹

3.2.4.2.-Marcado del ARN

Para el marcado del ARN (sonda) se utilizó la síntesis *in vitro* de ADN complementario. En los métodos más comunes; se coloca el ARN total junto con un desoxioligonucleótido poli-T y un conjunto de hexámeros al azar, permitiendo que reconozcan sus sitios en el ARN mensajero. Posteriormente, se agregan los desoxinucleótidos A, C, G y T, mas una proporción de desoxinucleótido T marcado con una molécula fluorescente (comúnmente, dUTP-alexa 555 y dUTP-alexa 647; también se pueden obtener los mismos fluoróforos unidos a dCTP). Se agrega transcriptasa inversa a la mezcla, la cual sintetiza el ADNc a partir del ARNm, incorporando el desoxinucleótido U o T marcado en dos reacciones estándares. Finalmente, se purifica el ADNc marcado para eliminar el desoxinucleótido fluorescente no incorporado al ADNc y se tiene la sonda marcada, lista para probarla en un microarreglo.²⁷

3.2.4.3.-Hibridación de los Microarreglos

El procedimiento consistió en aplicar la solución de hibridación con las sondas sobre la laminilla y cubrirla con un cubreobjetos para permitir que la solución cubra todo el microarreglo de igual forma que se hace una preparación para microscopía. La reacción es capilar y por eso requiere de muy poco volumen. Sin embargo, es importante señalar que se debe tener cuidado con la evaporación, por lo cual se recomienda que los microarreglos sean colocados en cámaras húmedas diseñadas para estos propósitos.²⁷

3.2.4.4.-Lectura de microarreglos

Se utilizó un equipo lector de microarreglos que utiliza un láser para excitar las moléculas fluorescentes unidas al ADN y poder obtener la imagen de cada una de las muestras contenidas en el microarreglo. Este procedimiento se hizo para cada uno de los fluoróforos obteniéndose dos imágenes, una para el fluoróforo Alexa 555 (rojo) y otra para el fluoróforo Alexa 647 (verde). Para la obtención de estas imágenes se ajusta la intensidad del láser y la sensibilidad de la cámara o de los fotomultiplicadores según sea el tipo de lector, de tal forma que ambas imágenes den valores semejantes de fluorescencia total. Comúnmente para lograr esto, en los microarreglos se colocan controles o marcadores que se utilizan para ajustar la señal de fluorescencia para ambos fluoróforos. Una vez obtenidas estas imágenes, se combinan para obtener un aspecto visual del microarreglo. Para la obtención de los valores cuantitativos de cada una de las señales de fluorescencia contenidas en el microarreglo, se realizó el análisis de las imágenes mediante el uso de software (GenArise). Con el cual se logran encontrar los genes que se encuentran sobreexpresados e inhibidos con un zscore mayor o menor a ± 1.5 desviación estándar según sea el caso.²⁷

3.2.4.5.-Análisis Bioinformático.

A través de los programas en línea David (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) se determinó en qué posibles rutas metabólicas están involucrados los genes sobre expresados e inhibidos en el ensayo del microarreglo de ratón.³⁰

3.2.5.- ANÁLISIS DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR

Se realizó el análisis de un posible receptor para los compuestos derivados de acetidin-2-ona. En base a los resultados del análisis de expresión génica del compuesto C-

089 sobre la línea celular B16F10 y de los antecedentes mencionados en dicho proyecto. Se logró proponer un posible blanco terapéutico. Se planteó que el posible receptor de los compuestos derivados de azetidin-2-onas, correspondía a la β -Tubulina, y se realizó la búsqueda de la estructura cristalina en la base de datos Protein Data Bank (PDB) en línea. Al no encontrarse ninguna estructura de β -Tubulina de ser humano se realizó el diseño de un modelo computacional del receptor (β -Tubulina) a través de los programas en línea I-TASSER y MODELLER con sus protocolos descritos también en línea.³¹⁻³² Se realizó el pre-tratamiento de las muestras así como la minimización de energía y geométrica de los ligandos (derivados de azetidin-2-ona) y el receptor en el modelo computacional de la β -Tubulina a través del programa Avogadro.³³ Se realizó el cambio de formato a pdbqt de los ligandos (derivados de azetidin-2-ona) y el receptor modelado de la β -Tubulina a través del programa Autodock tools.³⁴ Se realizó el análisis de acoplamiento molecular a través del programa Autodock vina.³⁴ Se realizó el análisis de interacción química de los ligandos (derivados de azetidin-2-ona) con el receptor modelado de la β -Tubulina.

3.2.6.- SEGURIDAD EN EL LABORATORIO Y DISPOSICIÓN DE LOS RESIDUOS

Se manejaron residuos tanto químicos como biológicos que se dispusieron en diversos contenedores como:

- A. Soluciones salinas pH 6.8, soluciones de: sales inorgánicas, ácidos inorgánicos, orgánicos y bases inorgánicas.
- D. Tóxicos inflamables, combinaciones orgánicas halogenadas líquidas, bases orgánicas y aminas.
- E. Muy tóxico, cancerígeno orgánico.

- Contenedor rojo. Residuos punzocortantes biológico-infecciosos.
- Contenedor amarillo. Residuos de órganos, tejidos, célula biológico-infecciosa.

Que se encuentran estratégicamente ubicados en el laboratorio de uso. Al final, el material biológico restante y físico reusable se esterilizó mediante calor húmedo.

CAPÍTULO 4

4.- RESULTADOS

4.1.-ENSAYOS DE VIABILIDAD, CITOTOXICIDAD Y ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

4.1.1.-Evaluación de la actividad citotóxica en células Chang

Inicialmente se trabajó con la línea celular Chang (Células humanas de hígado). Las células presentaron un crecimiento exponencial aproximadamente a las 72 horas, logrando una confluencia de hasta un 80% ($2.5-3.5 \times 10^6$ células/caja) en condiciones de crecimiento a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5% en medio MEM adicionado con suero fetal bovino al 10% y antibiótico al 1%. En el ensayo de viabilidad celular para determinar la actividad citotóxica, se utilizó la técnica de WST-1 para los 16 compuestos de azetidin-2-ona, a concentraciones de 10, 1, 0.1 y 0.01 μM. Se utilizaron como controles: control negativo, células sin tratar (proliferación normal al 100%); control positivo (Triton-X-100 al 10%) para una muerte celular al 100%; como testigo de citotoxicidad del medicamento comercial anticancerígeno Vincristina[®]; además de un control con el solvente DMSO al 10% esto para ver la influencia provocada por el solvente utilizado en la disolución de los compuestos. El ensayo se realizó por triplicado a las cuatro concentraciones mencionadas.

En la tabla 2 se presentan los resultados del promedio de los valores de porcentaje de citotoxicidad con los valores de desviación estándar, en la figura 8, se presenta el anillo de azetidin-2-ona con sus respectivas modificaciones en los radicales.

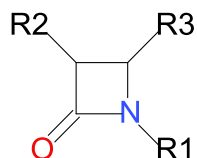


Figura 9. Anillo de azetidin-2-ona y sus radicales.

Tabla 2. Promedio y desviación estándar del porcentaje de actividad citotóxica en células Chang. Se probaron concentraciones de 10, 1, 0.1 y 0.01 μM de los 16 compuestos derivados de azetidin-2-ona y la Vincristina.

ID	R1	R2	R3	Conc. 10 μM	Conc. 1 μM	Conc. 0.1 Mm	Conc. 0.01 μM
C-081	$\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4-$	$p\text{-CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4-$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}-$	87.36 ± 2.1	52.60 ± 6.1	50.60 ± 8.9	44.36 ± 9.8
C-082	$\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4-$	C_6H_5-	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}-$	72.93 ± 7.1	25.94 ± 12	17.90 ± 9.1	12.74 ± 1.5
C-083	$\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4-$	$p\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_5-$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}-$	68.47 ± 3.3	40.24 ± 1.8	21.10 ± 1.7	2.77 ± 2.4
C-084	$\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4-$	$o\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_5-$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}-$	69.90 ± 12.1	23.44 ± 10.8	9.94 ± 1.7	2.10 ± 0.7
C-085	$\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4-$	$p\text{-FC}_6\text{H}_5-$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}-$	72.87 ± 2.3	50.57 ± 2.9	31.00 ± 3.0	22.97 ± 5.1
C-089	$\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4-$	$p\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_5-$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}-$	21.40 ± 6.1	14.94 ± 0.3	4.60 ± 0.5	5.47 ± 1.5
C-095	$\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4-$	$p\text{-FC}_6\text{H}_5-$	$\text{CH}_3\text{O}-$	50.27 ± 8.9	40.87 ± 7.8	29.80 ± 7.3	18.14 ± 3.7
C-096	$\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4-$	$p\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_5-$	$\text{CH}_3\text{O}-$	47.97 ± 1.5	4.74 ± 2.8	3.30 ± 1.4	2.30 ± 1.1
C-097	$\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4-$	$o\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_5-$	$\text{CH}_3\text{O}-$	50.92 ± 3.1	3.47 ± 2.5	2.34 ± 2.1	1.84 ± 1.3
C-098	$\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4-$	$p\text{-CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4-$	$\text{CH}_3\text{O}-$	54.93 ± 9.1	8.34 ± 2.6	3.68 ± 3.2	2.00 ± 1.5
C-099	$\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4-$	$p\text{-ClC}_6\text{H}_4-$	$\text{CH}_3\text{O}-$	73.91 ± 7.7	12.72 ± 7.9	9.00 ± 5.6	4.50 ± 0.8
C-100	$\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4-$	$p\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4-$	$\text{CH}_3\text{O}-$	72.05 ± 3.7	9.60 ± 3.6	3.00 ± 2.0	1.30 ± 0.5
C-128	$\text{C}_7\text{H}_4\text{NS}-$	$p\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_5-$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}-$	90.23 ± 0.1	88.53 ± 0.5	50.83 ± 9.5	23.13 ± 5.8
C-129	$\text{C}_7\text{H}_4\text{NS}-$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}-$	85.52 ± 0.3	81.17 ± 1.9	79.60 ± 5.2	9.56 ± 5.7
C-130	$\text{C}_7\text{H}_4\text{NS}-$	$p\text{-ClC}_6\text{H}_4-$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}-$	88.91 ± 2.6	85.31 ± 1.4	26.28 ± 10.1	12.73 ± 6.6
C-131	$\text{C}_7\text{H}_4\text{NS}-$	$\text{C}_5\text{H}_4\text{N}$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}-$	74.36 ± 3.5	60.01 ± 13.5	4.19 ± 3.3	2.93 ± 2.0
Vincristina				79.27 ± 7.7	63.35 ± 7.9	41.92 ± 9.6	25.68 ± 0.8

En la tabla anterior se puede observar una actividad citotóxica presente en los diferentes compuestos derivados de azetidin-2-ona, en especial los compuestos de la serie A (3-fenoxi azetidin-2-ona) presentan un porcentaje entre 68-87 % de citotoxicidad a 10 μM , con excepción del compuesto C-089. En cambio la serie B que son los compuestos derivados de 3-metoxi azetidin-2-ona, presentan un porcentaje entre 47-73 % de citotoxicidad a una concentración de 10 μM .

4.1.2.- Evaluación de la actividad citotóxica en células SiHa

Posteriormente se trabajó con la línea celular SiHa(células humanas de cáncer cervicouterino) para demostrar la actividad citotóxica sobre una línea cancerígena y demostrar así la actividad anticancerígena.

Siguiendo los mismos pasos que para la línea celular Chang, se logró determinar la proliferación y viabilidad celular por medio de la técnica WST-1 de 8 derivados de azetidin-2-ona, este ensayo se realizó por triplicado a las mismas cuatro concentraciones mencionadas que con las células Chang.

La tabla 3 muestra los resultados del promedio del porcentaje de viabilidad de los 8 compuestos probados sobre la línea celular SiHa con sus respectivas desviaciones estándar.

Tabla 3. Promedio y desviación estándar del porcentaje de actividad citotóxica en células SiHa. Se probaron concentraciones de 10, 1, 0.1 y 0.01 μM de 8 compuestos derivados de azetidin-2-ona y la Vincristina.

ID	R1	R2	R3	Conc. 10 μM	Conc. 1 μM	Conc. 0.1 μM	Conc. 0.01 μM
C-081	$\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4-$	$p-\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4-$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}-$	86.4 ± 2.1	49.5 ± 11.4	33.0 ± 5.1	27.2 ± 7.2
C-082	$\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4-$	C_6H_5-	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}-$	88.40 ± 1.0	43.51 ± 4.7	41.95 ± 6.9	41.95 ± 3.9
C-083	$\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4-$	$p-\text{NO}_2\text{C}_6\text{H}_5-$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}-$	62.54 ± 2.2	32.21 ± 1.7	31.25 ± 3.9	25.55 ± 6.8
C-084	$\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4-$	$o-\text{NO}_2\text{C}_6\text{H}_5-$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}-$	75.41 ± 3.0	56.52 ± 2.7	46.20 ± 12.5	30.36 ± 2.0
C-085	$\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4-$	$p-\text{FC}_6\text{H}_5-$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}-$	83.55 ± 2.1	53.75 ± 8.5	52.85 ± 8.9	40.60 ± 5.5
C-089	$\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4-$	$p-\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_5-$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}-$	80.75 ± 9.5	54.94 ± 7.7	43.13 ± 6.1	40.61 ± 2.3
C-095	$\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4-$	$p-\text{FC}_6\text{H}_5-$	$\text{CH}_3\text{O}-$	82.7 ± 5.5	28.9 ± 5.2	18.5 ± 9.7	9.6 ± 8.5
C-128	$\text{C}_7\text{H}_4\text{NS}-$	$p-\text{NO}_2\text{C}_6\text{H}_5-$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}-$	84.9 ± 2.1	82.6 ± 2.5	42.4 ± 5.6	21.4 ± 3.4
Vincristina				92.9 ± 7.1	77.7 ± 4.1	70.1 ± 7.2	55.2 ± 6.4

4.1.3.- Evaluación de la actividad citotóxica en células B16F10

La última parte del ensayo de citotoxicidad se realizó con la línea celular B16F10 (células de melanomamurino).

La tabla 4 muestra los resultados del promedio del porcentaje de viabilidad de los 16 compuestos probados sobre la línea celular B16F10 con sus respectivas desviaciones estándar.

Tabla 4. Promedio y desviación estándar del porcentaje de actividad citotóxica en células B16F10. Se probaron concentraciones de 10, 1, 0.1 y 0.01 μM de los 16 compuestos derivados de azetidin-2-ona y la Vincristina.

ID	R1	R2	R3	Conc. 10 μM	Conc. 1 μM	Conc. 0.1 μM	Conc. 0.01 Mm
C-081	$\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4^-$	$p\text{-CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4^-$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}^-$	52.30 ± 7.6	32.63 ± 2.7	23.12 ± 2.9	17.12 ± 1.7
C-082	$\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4^-$	C_6H_5^-	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}^-$	72.70 ± 9.8	63.14 ± 9.0	57.93 ± 6.8	44.16 ± 7.1
C-083	$\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4^-$	$p\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_5^-$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}^-$	63.48 ± 6.2	47.17 ± 7.0	43.15 ± 9.9	26.49 ± 7.2
C-084	$\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4^-$	$o\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_5^-$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}^-$	48.37 ± 8.7	46.65 ± 11.2	38.43 ± 7.9	12.07 ± 1.6
C-085	$\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4^-$	$p\text{-FC}_6\text{H}_5^-$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}^-$	53.85 ± 2.7	44.09 ± 7.8	38.01 ± 7.1	15.28 ± 6.0
C-089	$\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4^-$	$p\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_5^-$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}^-$	82.49 ± 2.3	48.47 ± 5.6	8.44 ± 7.1	2.68 ± 1.7
C-095	$\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4^-$	$p\text{-FC}_6\text{H}_5^-$	CH_3O^-	70.16 ± 8.0	27.51 ± 10.6	22.96 ± 3.8	19.81 ± 4.4
C-096	$\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4^-$	$p\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_5^-$	CH_3O^-	81.36 ± 1.1	29.16 ± 3.5	19.33 ± 3.0	1.80 ± 1.7
C-097	$\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4^-$	$o\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_5^-$	CH_3O^-	66.28 ± 3.9	31.01 ± 4.2	27.15 ± 5.4	17.24 ± 5.0
C-098	$\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4^-$	$p\text{-CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4^-$	CH_3O^-	74.18 ± 1.5	28.31 ± 3.8	27.51 ± 1.2	20.79 ± 3.9
C-099	$\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4^-$	$p\text{-ClC}_6\text{H}_4^-$	CH_3O^-	48.56 ± 4.0	25.96 ± 4.4	21.53 ± 4.5	20.50 ± 3.0
C-100	$\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4^-$	$p\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4^-$	CH_3O^-	74.57 ± 5.0	13.75 ± 4.3	12.78 ± 4.6	5.28 ± 4.6
C-128	$\text{C}_7\text{H}_4\text{NS}^-$	$p\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_5^-$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}^-$	80.52 ± 1.7	64.60 ± 5.5	26.88 ± 2.6	14.25 ± 3.2
C-129	$\text{C}_7\text{H}_4\text{NS}^-$	$\text{C}_4\text{H}_3\text{O}^-$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}^-$	80.33 ± 4.7	66.97 ± 1.4	35.56 ± 7.6	10.12 ± 5.1
C-130	$\text{C}_7\text{H}_4\text{NS}^-$	$p\text{-ClC}_6\text{H}_4^-$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}^-$	80.44 ± 3.3	74.47 ± 1.2	26.58 ± 1.7	18.49 ± 5.8
C-131	$\text{C}_7\text{H}_4\text{NS}^-$	$\text{C}_5\text{H}_4\text{N}^-$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}^-$	79.24 ± 2.4	31.74 ± 5.0	22.95 ± 5.5	15.62 ± 3.3
Vincristina				80.30 ± 1.1	74.69 ± 1.6	65.89 ± 2.2	47.41 ± 1.3

En la tabla anterior podemos observar actividad citotóxica en la línea celular cancerígena, la cual está presente en casi todos los compuestos derivados de azetidin-2-ona, por ejemplo en la serie A, para el compuesto C-081 se logra ver un porcentaje de citotoxicidad muy similar al presentado por la vincristina, en cambio en la serie B observamos que el compuesto C-099 presenta un porcentaje de citotoxicidad pobre con un 48 % a una concentración de 10 μM . Sin embargo en la serie C podemos observar una actividad muy prometedora debido a que presenta un porcentaje de 80 % de citotoxicidad, parecido al de la Vincristina.

4.1.4.- Concentración inhibitoria media de los compuestos derivados de azetidin-2-ona, en las líneas celulares Chang, SiHa y B16F10

Para la determinación de la concentración inhibitoria media (CI_{50}), se utilizó el programa GraphPadPrism 6 y a partir de los resultados de citotoxicidad a las concentraciones 10, 1, 0.1 y 0.01 de cada uno de los 16 compuestos derivados de azetidin-2-ona en las tres líneas celulares Chang, SiHa y B16F10. En la Tabla 5 se muestran los valores de CI_{50} de los 16 compuestos derivados de azetidin-2-ona.

Tabla 5. Valores de Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}) de los 16 compuestos derivados de azetidin-2-ona en las tres líneas celulares Chang, SiHa y B16F10.

ID	R1	R2	R3	CHANG (CI_{50} μ M)	SIHA (CI_{50} μ M)	B16F10 (CI_{50} μ M)
C-081	CH ₃ OC ₆ H ₄ -	p-CH ₃ OC ₆ H ₄ -	C ₆ H ₅ O-	0.6319	0.4255	9.686
C-082	CH ₃ OC ₆ H ₄ -	C ₆ H ₅ -	C ₆ H ₅ O-	2.85	0.2024	0.2884
C-083	CH ₃ OC ₆ H ₄ -	p-NO ₂ C ₆ H ₅ -	C ₆ H ₅ O-	2.08	3.642	0.8728
C-084	CH ₃ OC ₆ H ₄ -	o-NO ₂ C ₆ H ₅ -	C ₆ H ₅ O-	3.732	0.2262	4.82
C-085	CH ₃ OC ₆ H ₄ -	p-FC ₆ H ₅ -	C ₆ H ₅ O-	0.7464	0.0850	3.26
C-089	CH ₃ OC ₆ H ₄ -	p-CH ₃ C ₆ H ₅ -	C ₆ H ₅ O-	>10.00	0.0726	1.214
C-095	CH ₃ OC ₆ H ₄ -	p-FC ₆ H ₅ -	CH ₃ O-	7.573	2.896	2.829
C-096	CH ₃ OC ₆ H ₄ -	p-NO ₂ C ₆ H ₅ -	CH ₃ O-	>10.00	*NR	2.081
C-097	CH ₃ OC ₆ H ₄ -	o-NO ₂ C ₆ H ₅ -	CH ₃ O-	9.756	*NR	2.917
C-098	CH ₃ OC ₆ H ₄ -	p-CH ₃ OC ₆ H ₄ -	CH ₃ O-	8.384	*NR	2.05
C-099	CH ₃ OC ₆ H ₄ -	p-ClC ₆ H ₄ -	CH ₃ O-	3.41	*NR	>10.00
C-100	CH ₃ OC ₆ H ₄ -	p-CH ₃ C ₆ H ₄ -	CH ₃ O-	3.92	*NR	4.127
C-128	C ₇ H ₄ NS-	p-NO ₂ C ₆ H ₅ -	C ₆ H ₅ O-	0.0778	0.1238	0.4555
C-129	C ₇ H ₄ NS-	C ₄ H ₃ O	C ₆ H ₅ O-	0.0093	*NR	0.3437
C-130	C ₇ H ₄ NS-	p-ClC ₆ H ₄ -	C ₆ H ₅ O-	0.2304	*NR	0.311
C-131	C ₇ H ₄ NS-	C ₅ H ₄ N	C ₆ H ₅ O-	1.035	*NR	1.704
Vincristina				0.00966	0.00511	0.01059

4.2.- DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD APOPTÓTICA MEDIANTE EL ENSAYO DE CASPASA-3

Para determinar los valores de apoptosis en las células B16F10, se requirió primero cuantificar las proteínas por el método Bradford, para lo cual se realizó una curva de calibración que se presenta en la figura 10.

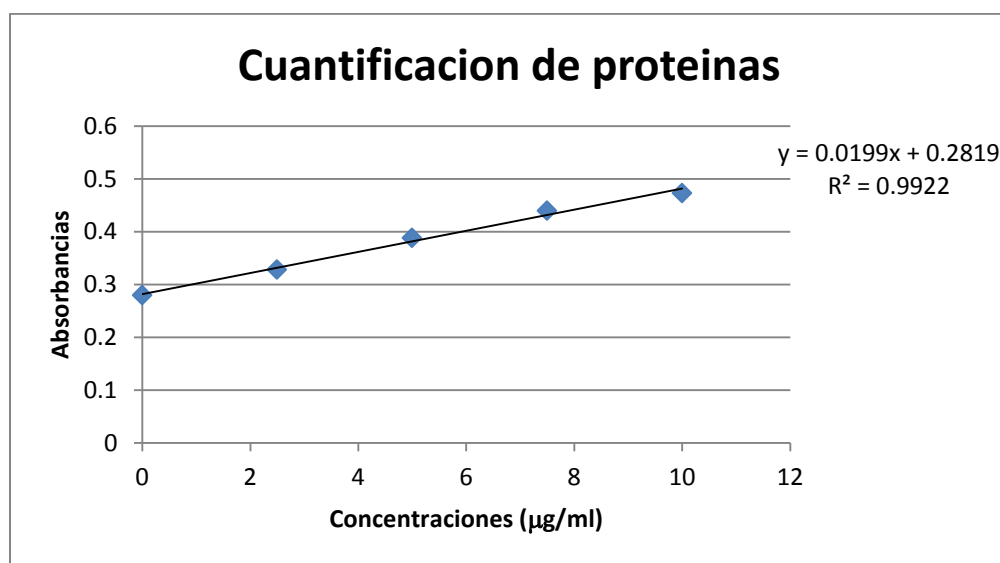


Figura 10. Curva de calibración para determinar la concentración de proteínas a través del método de Bradford.

Esta gráfica se tomó como referencia para realizar la cuantificación de las proteínas totales de las muestras en estudio y así lograr unificar todos los ensayos a una misma concentración de 200µg de proteínas. A partir de dichas muestras, se mediría la absorbancia de lap-nitroanilina libre, la cual se realiza a 405 nm de longitud de onda. En la figura 11 se muestra gráficamente la forma en que trabaja el sistema y en la tabla 6 y figura 12, se muestran los resultados de este experimento.

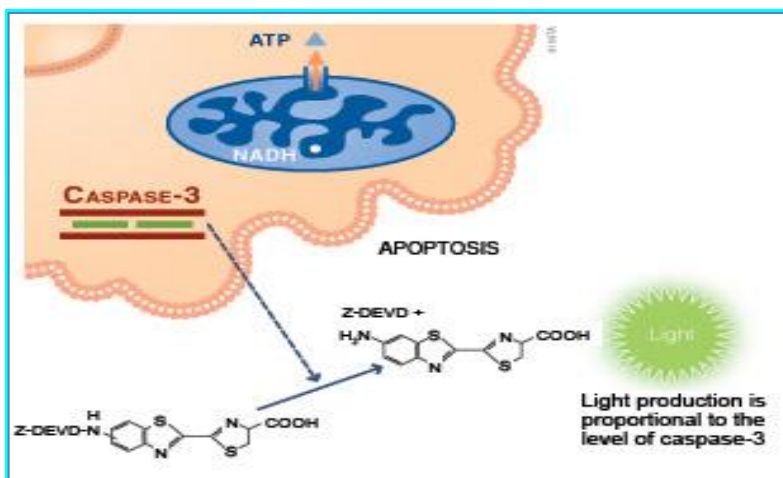


Figura 11. La actividad de caspasa-3. Se observa cómo actúa sobre el sustrato pNA DEVD, para producir una diferencia colorimétrica.

Con los datos obtenidos de los compuestos C-089, C-096 y C-129, generados por la reacción previamente mencionada para determinar la actividad de la enzima caspasa-3 y el referente del control positivo (podofilotoxina), se comparó y se logró concluir que los compuestos presentan actividad apoptótica sobre células cancerígenas (Tabla 6).

Tabla 6. Actividad Apoptótica de los compuestos cabeza de serie versus la podofilotoxina.

Compuesto	Absorbancias	Actividad Apoptótica
Podofilotoxina	0.267	Positivo
Negativo (células sin tratar)	0.117	Negativo
C-089	0.266	Positivo
C-096	0.234	Positivo
C-129	0.247	Positivo

Como se puede observar en la tabla anterior los compuestos más representativos de cada serie, para la serie A el compuesto C-089, la serie B representada por el compuesto C-096 y la serie C por el compuesto C-129. Además en la figura 12, se puede observar

visualmente el efecto celular provocado por uno de los compuestos así como la podofilotoxina.

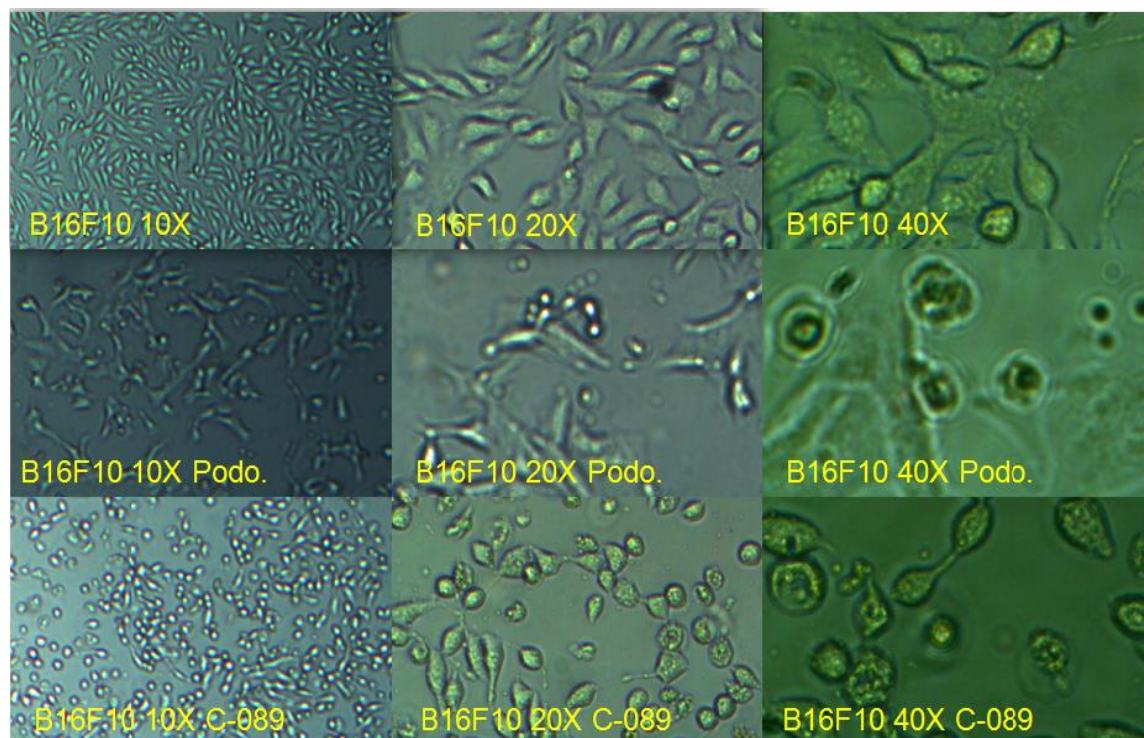


Figura 12. Células B16F10 en condiciones de apoptosis con la podofilotoxina y C-089. Es evidente la presencia de apoptosis en ambos casos por la presencia de muerte celular organizada donde la célula va desprendiendo vesículas después de que se ha fragmentado su material genético.

4.3.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA A TRAVÉS DE MICROARREGLOS DE ADN

4.3.1.- Condiciones de las muestras en estudio

Se realizó el crecimiento y proliferación de la línea celular B16F10 (melanoma de ratón) de lo cual se obtuvieron células disociadas resuspendidas en medio de cultivo MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, en una caja de cultivo a una densidad celular de aproximadamente $3-5 \times 10^6$ células por mililitro. Posteriormente, se incubó las células 24 horas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ y se añadieron 10 µL de una solución stock

para tener una concentración final de 1.2 μ M, el CI₅₀ del compuesto C-089, así como un control negativo con células sin tratar. Después se incubó por 24 horas a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂.

4.3.2.- Extracción del ARN

Como se muestra en la figura 13, las muestras de ARN fueron exitosamente extraídas de las células cancerígenas en condiciones normales y tratadas con el compuesto C-89. Cabe destacar que las dos bandas que presentan los carriles 1, 2 y 4 corresponden a las dos subunidades de ARN ribosomal. Por representar éste más del 90% del ARN total celular, es finalmente quien nos indica si hubo una extracción eficiente, aunque en realidad, con el que se trabaja más adelante es con el ARN mensajero.

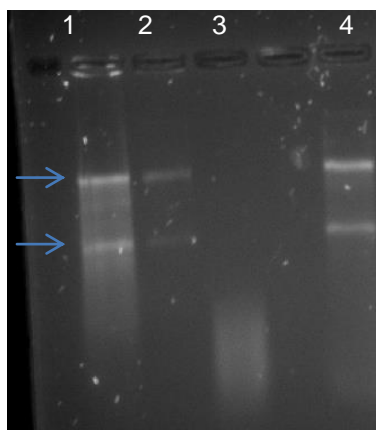


Figura 13. Electroforesis en gel agarosa al 1% de ARN total. Se presentan las muestras control (línea 1 y 2) y tratada (línea 4), teñido con bromuro de etidio, utilizando el programa Gel Doc XR en un fotodocumentador (Bio-Rad).

4.3.3.- Lectura y cuantificación del microarreglo

El microarreglo hibridado fue leído de manera que las intensidades de cada punto representativo de cada gen fueron cuantificadas. A continuación se muestran las imágenes obtenidas del microarreglo de ratón (Figura 14).



Figura 14.Una parte del microarreglo de ADN de ratón. Se presenta solo un detalle con el fin de poder apreciar los elementos verdes y rojos.

4.3.4.- Análisis bioinformático

Para el análisis del microarreglo se utilizó el programa estadístico Gen-Arise, con el que se extrajeron del chip de ADN los genes que se encuentran sobre-expresados e inhibidos por el compuesto C-089 en células de melanoma de ratón (teñidos en verde o rojo). Siendo los de importancia biológica los que se encuentran con una desviación estándar por encima o por debajo de 1.5. En este rango se encontraron 676 genes inhibidos y 1524 genes sobre expresados como se muestra en la figura 15. La lista completa de genes, se anexa a esta tesis como archivo electrónico de hoja de cálculo.

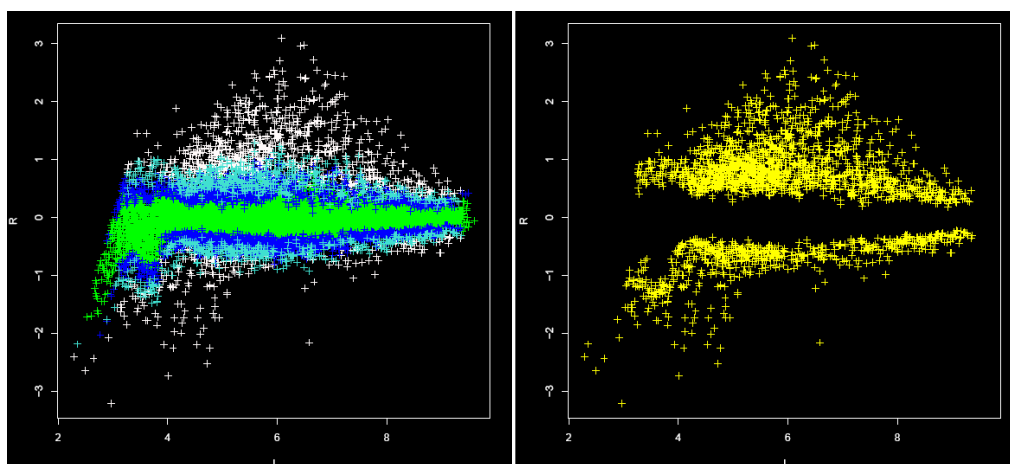


Figura 15. Valores de Z-score para el análisis de microarreglos del compuesto C-089 sobre la línea celular B16H10. En la gráfica de la izquierda se observan todos los genes presentes en el microarreglo de ratón, analizados en este experimento, mientras que en el lado derecho, se exhiben solo aquellos genes sobre-expresados e inhibidos (puntos amarillos por encima y por debajo de 0) por acción del compuesto C-089.

Con el fin de rastrear la importancia biológica de los genes identificados, se echó mano del programa en línea DAVID (TheDatabaseforAnotation, Visualitation and IntegratedDiscovery),³⁰ que es una herramienta útil para el estudio de la expresión génica, en donde se encontraron diferentes rutas bioquímicas involucradas en la muerte celular, como el proceso de apoptosis y la síntesis del citoesqueleto, así como los procesos de división celular. Y aunque todavía es necesario un estudio más detallado de los resultados

se puede sugerir fuertemente que los compuestos inducen apoptosis y dañan el citoesqueleto (Figuras 16, 17 y 18).

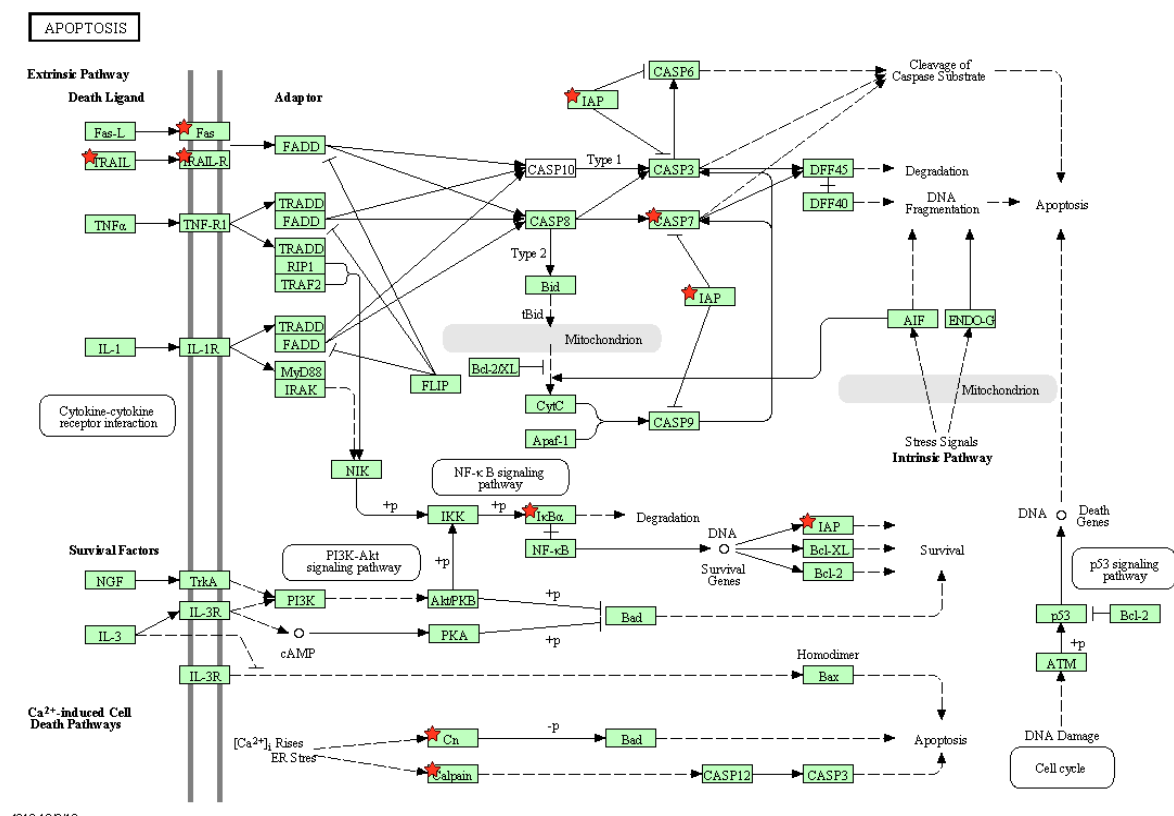


Figura 16.- Diagrama arrojado por DAVID de genes sobre-expresados que se encuentran involucrados en la apoptosis. Se marcan con estrellas rojas, los genes involucrados. La tabla 7 muestra la lista de genes.

Tabla 7.- Lista de genes sobreexpresados en la vía de apoptosis

1	Fas (TNF receptor superfamily member 6)
2	baculoviral IAP repeat-containing 2
3	calpain 1
4	caspase 7
5	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
6	protein phosphatase 3, catalytic subunit, beta isoform
7	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
8	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b

10	fibroblast growth factor 2
11	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 12
12	guanine nucleotide binding protein, alpha 13
13	integrin alpha X
14	integrin beta 3
15	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type 1 alpha
16	related RAS viral (r-ras) oncogenehomolog 2
17	similar to FGF23; fibroblast growth factor 23

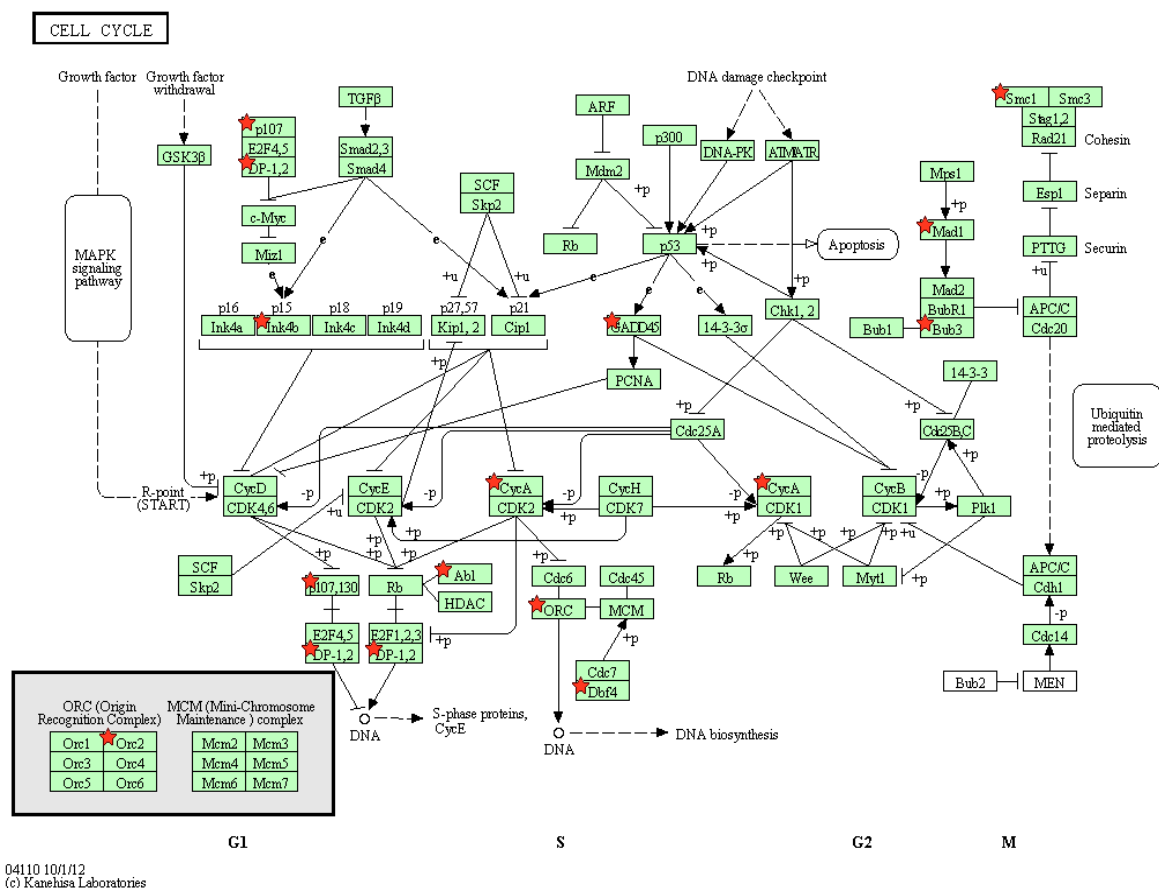


Figura 18.- Diagrama arrojado por DAVID de genes inhibidos que se encuentran involucrados en la división celular. Se marcan con estrellas rojas, los genes involucrados. La tabla 9 muestra la lista de genes.

Tabla 9.- Lista de genes inhibidos en la vía del ciclo celular.

1	DBF4 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
2	budding uninhibited by benzimidazoles 3 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
3	c-abl oncogene 1, receptor tyrosine kinase
4	cyclin A2
5	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta
6	mitotic arrest deficient 1-like 1
7	origin recognition complex, subunit 2-like (<i>S. cerevisiae</i>)
8	predicted gene 7390; transcription factor Dp 1; similar to Transcription factor Dp-1 (E2F dimerization partner 1) (DRTF1-polypeptide 1)
9	retinoblastoma-like 1 (p107)
10	similar to Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B (p14-INK4b) (p15-INK4b); cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)
11	structural maintenance of chromosomes 1A

4.4.- ANÁLISIS DEL ACOPLAMIENTO MOLECULAR

Al no contar en la base de datos de estructuras proteicas del RCSB (ResearchcollaboratoryforStructuralBioinformatics) con información de β -tubulina humana, se procedió a diseñarla con ayuda de los programas I-TASSER y MODELLER y la secuencia de aminoácidos registrada en el NCBI con la clave NP_821080.1 que se presenta en la figura 19. La figura 20 muestra la estructura de la β -tubulina humana diseñada.

```

1  MREIVHIQAG QCGNQIGAKF WEVISDEHGI DPTGSYHGDS DLQLERINVY YNEATGNKYV
61  PRAILDLEP GTMDSVRSGP FGQIFRPDNF VFGQSGAGNN WAKGHYTEGA ELVDSVLDVV
121 RKESESCDCL QGFQLTHSLG GGTGSGMGTI LISKIREEYP DRIMNTFSVM PSPKVS DTVV
181 EPYNATLSVH QLVENTDETY CIDNEALYDI CFRTLKLTTP TYGDLNHLVS ATMSGVTTCL
241 RFPGQLNADL RKLAVNMVPF PRLHFFMPGF APLTSRGSQQ YRALTVPELT QQMFDSKNMM
301 AACDPRHGRY LTVAAIFRGR MSMKEVDEQM LNVQKNSSY FVEWIPNNVK TAVCDIPPRG
361 LKMSATFIGN STAIQELFKR ISEQTAMFR RKAFLHWYTG EGMDMEFTE AESNMNDLVS
421 EYQQYQDATA DEQGEFEEEE GEDEA

```

Figura 19.- Secuencia de aminoácidos de la β -tubulina humana.



Figura 20.- Molécula de β -tubulina diseñada.

Utilizando el sitio de unión de la colchicina en la β -tubulina, se realizaron los ensayos de acoplamiento molecular de los 16 derivados de azetidin-2-ona, tomando como

control la colchicina. Se encontró un patrón de energía libre de acoplamiento en Kcal/mol parecida a la colchicina. (Tabla 10).

Tabla 10.- Energía de acoplamiento molecular (docking) de los compuestos derivados de azetidin-2-ona en el sitio de unión de la β -tubulina.

ID	R1	R2	R3	Docking Kcal/mol
C-081	CH ₃ OC ₆ H ₄ -	<i>p</i> -CH ₃ O-	C ₆ H ₅ O-	-7.2
C-082	CH ₃ OC ₆ H ₄ -	H-	C ₆ H ₅ O-	-7.2
C-083	CH ₃ OC ₆ H ₄ -	<i>p</i> -NO ₂ -	C ₆ H ₅ O-	-7.4
C-084	CH ₃ OC ₆ H ₄ -	<i>o</i> -NO ₂ -	C ₆ H ₅ O-	-7.8
C-085	CH ₃ OC ₆ H ₄ -	<i>p</i> -F-	C ₆ H ₅ O-	-7.7
C-089	CH ₃ OC ₆ H ₄ -	<i>p</i> -CH ₃ -	C ₆ H ₅ O-	-7.8
C-095	CH ₃ OC ₆ H ₄ -	<i>p</i> -F-	CH ₃ O-	-6.8
C-096	CH ₃ OC ₆ H ₄ -	<i>p</i> -NO ₂ -	CH ₃ O-	-6.4
C-097	CH ₃ OC ₆ H ₄ -	<i>o</i> -NO ₂ -	CH ₃ O-	-6.9
C-098	CH ₃ OC ₆ H ₄ -	<i>p</i> -CH ₃ O-	CH ₃ O-	-6.4
C-099	CH ₃ OC ₆ H ₄ -	<i>p</i> -Cl-	CH ₃ O-	-6.6
C-100	CH ₃ OC ₆ H ₄ -	<i>p</i> -CH ₃ -	CH ₃ O-	-6.8
C-128	C ₇ H ₄ NS-	<i>p</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ -	C ₆ H ₅ O-	-7.8
C-129	C ₇ H ₄ NS-	C ₄ H ₃ O	C ₆ H ₅ O-	-7.8
C-130	C ₇ H ₄ NS-	<i>p</i> -ClC ₆ H ₄ -	C ₆ H ₅ O-	-8
C-131	C ₇ H ₄ NS-	C ₅ H ₄ N	C ₆ H ₅ O-	-7.4
Colchicina				-7.4

Enseguida se procedió a realizar el análisis de las interacciones químicas entre los compuestos con el sitio de unión de la colchicina en la molécula de β -tubulina. En este ensayo se encontraron como regiones importantes de unión, tanto para el medicamento control, como para los compuestos probados, siete aminoácidos, a saber: Cys 239, Lys 252, Val 316, Lys 350, Leu 246 y Ala 248. La figura 21 muestra dichas interacciones.

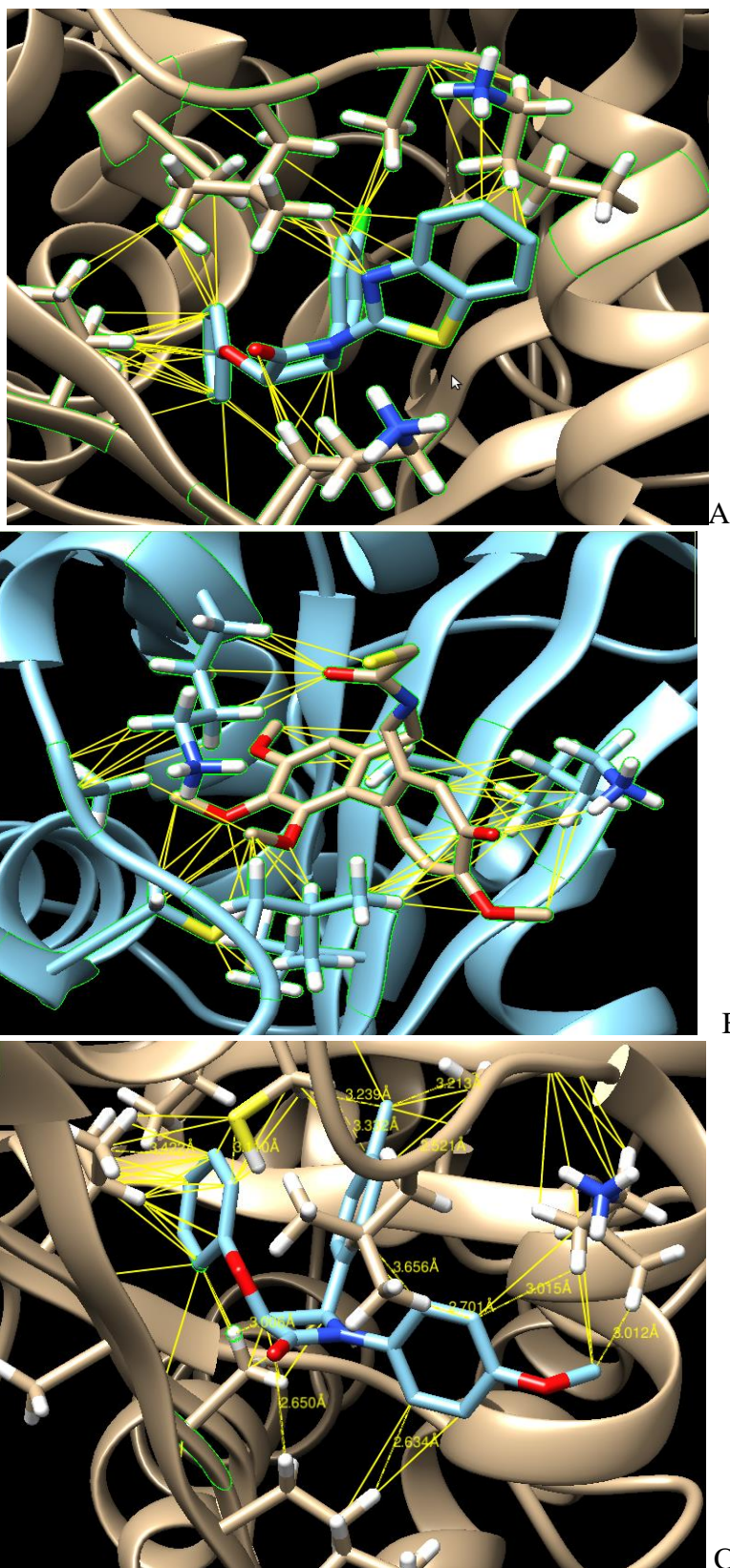


Figura 21.- Interacciones moleculares con la β -tubulina humana. A) Interacciones químicas del compuesto C-130; B) Interacciones químicas de la colchicina; C) Interacciones químicas del compuesto C-089.

CAPITULO 5

5.- DISCUSIÓN

En términos de efectividad citotóxica, podría decirse que los compuestos derivados de benzotiazol son los que presentaron la mayor actividad incluso comparable con la vincristina, sin embargo, para fines prácticos, algunos de los compuestos derivados fenoxi, además de una buena citotoxicidad han evidenciado una interesante selectividad celular hacia células cancerígenas tal como se puede ver en la tabla 5. Ahí podemos observar que los derivados de benzotiazol son tóxicos incluso para los hepatocitos, mientras que algunos derivados fenoxi presentan selectividad. Particularmente para los compuestos C-082 y C-089 que serían el 4-fenoxi y el *p*-metilfenoxi, esta especificidad está bien evidenciada de acuerdo a los datos de la concentración inhibitoria 50. De ellos, se decidió elegir el compuesto C-089 para continuar con los estudios moleculares.

Haciendo una comparación entre C-089 y C-100 que son los compuestos homólogos pero el primero de la serie fenoxi y el segundo de la serie metoxi, se puede sugerir que un fenoxi marca la importancia de la actividad biológica que al parecer se ve perdida en el respectivo metoxi. (Ver Tabla 5).

Lo mismo sucede para los compuestos C-085 y C-095 que poseen estructuras homólogas solo que el primero es de la serie fenoxi y el segundo de la serie metoxi en la posición 3, y exhiben una marcada diferencia en cuanto a la actividad citotóxica ya que ésta se ve incrementada considerablemente en la presencia del fenoxi al compararlo con el metoxi. Bajo esta única diferencia, la actividad biológica se ve dramáticamente modificada. (Ver tabla 5).

Cabe destacar los hallazgos de Carr y colaboradores¹⁴ sobre el impacto de un hidroxilo en posición meta del 4-metoxifenil en el compuesto **12**, lo cual cambia dramáticamente la actividad biológica de las azetidin-2-onas haciéndolas más potentes cuando el hidroxilo está presente (Ver Figura 22 y Tabla 11) lo que nos permite sugerir la adición de hidroxilos a los compuestos C-082 y C-089 esperando mejorar aún más su actividad sin perder la especificidad.

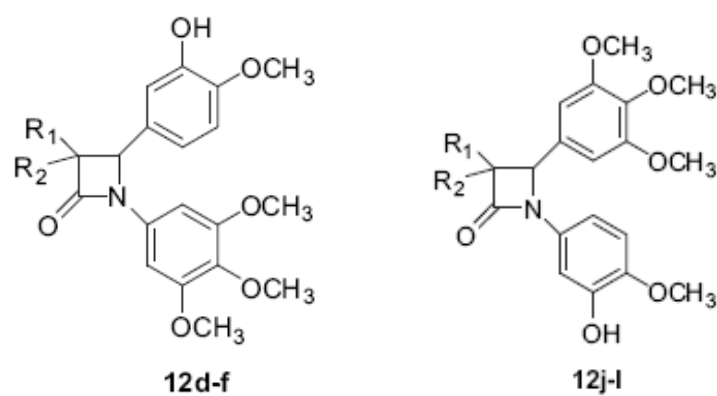


Figura 22.- Estructuras de los compuestos 12 reportados por Carr y colaboradores.¹⁴

Tabla 11.- Actividad antiproliferativa dramáticamente alterada al cambiar un hidroxilo por un metoxilo¹⁴.

Compound Number	R ₁	R ₂	Antiproliferative activity ^{a,b} MCF-7 cells IC ₅₀ value (μM)
12d	H	H	0.017 ± 0.002
12e^d	CH ₃	H	0.010 ± 0.0032
12f	CH ₃	CH ₃	0.25 ± 0.08
12j	H	H	0.130 ± 0.054
12k^d	CH ₃	H	2.96 ± 0.61
12l	CH ₃	CH ₃	4.04 ± 2.35
2 (CA-4)	—	—	0.0031

De acuerdo a los datos arrojados por Banik y colaboradores⁹ sobre el estudio del mecanismo de acción de las azetidín-2-onas, se procedió a continuar la fase experimental evaluando la actividad apoptótica de los compuestos. En este caso se utilizó un estuche comercial de ELISA que evalúa la actividad de Caspasa-3, una enzima clave en el desarrollo de apoptosis cuya secuencia de reconocimiento en su sustrato es un tetrapéptido formado por los aminoácidos Aspartato-Glutamato-Valina-Aspartato (DEVD) y que está presente en el reactivo del estuche comercial unido a *p*-nitroanilina. De tal manera que una vez que la caspasa 3 reacciona en caso de que estuviera presente por la presencia de apoptosis, la *p*-nitroanilina se libera y emite luz en el visible que puede ser medida con el lector. Posteriormente estos datos serían confirmados en la estrategia experimental con el ensayo de microarreglos.

La mayoría de los estudios con tecnologías de alto rendimiento para análisis de expresión génica por microarreglos de ADN, en el área de terapias emergentes contra el cáncer, están enfocados a evaluar la drogoresistencia en diferentes líneas celulares de cáncer, por lo que resultan bastante atractivos los resultados aquí obtenidos, desde el punto de vista que se trata del primer trabajo en el que se busca elucidar el mecanismo de acción de una nueva molécula prometedora como anticancerígeno usando microarreglos de ADN. En los estudios previos, se ha encontrado como podría esperarse, la sobreexpresión de genes MDR en los casos de resistencia a vincristina y paclitaxel³⁵, así como de genes de enzimas destoxificantes. Interesantemente encuentran también la inhibición de genes de apoptosis y la inducción de genes del ciclo celular, que va en contraste con nuestros resultados, pero en total concordancia con el modelo ya que en tales estudios tenían un

efecto de resistencia al fármaco mientras que en el modelo aquí presentado, se puede confirmar un bien documentado efecto pro-apoptótico y citotóxico.^{36, 37}

En el caso del estudio de acoplamiento molecular se seleccionó como proteína receptora de los ligandos a la β -tubulina, tomando en consideración los antecedentes científicos expuestos por O'Boyle¹⁶ quien realizó un análisis del acoplamiento molecular de compuestos derivados de azetidin-2-ona en el sitio de unión de la colchicina en la β -tubulina bovina (pdb 1SA0). Al mostrar los resultados que nosotros obtuvimos del análisis de expresión génica en el microarreglo de ratón, una influencia en la muerte celular a través de la regulación del citoesqueleto y la apoptosis por el compuesto C-089, nos dio la pauta para ejecutar el análisis con una β -tubulina humana diseñada especialmente para este trabajo al no existir una previamente en las bases de datos. La β -tubulina así obtenida al analizarla con el programa PyMOL, mostró un valor de desviación de la raíz cuadrada media (RMS) de 0.530 en comparación con 1SA0 que al estar por debajo de 1, habla de un buen modelado que refleja una considerable similitud de la proteína así diseñada al patrón de referencia que es la proteína obtenida por cristalografía. Al realizar los estudios de interacciones moleculares con el programa Chymera, pudimos confirmar que el compuesto C-089 presentaba las mismas interacciones que la colchicina hacia la β -tubulina con los aminoácidos Cys 239, Lys 252, Val 316, Lys 350, Leu 246 y Ala 248. Cabe destacar que también se hicieron ensayos de acoplamiento con la β -tubulina pero utilizando como ligando la vincristina en el sitio de unión de colchicina y de la misma forma, se probó el compuesto C-089 en el sitio de unión de la vincristina, sin embargo, ninguno de estos ensayos mostró un eficiente acoplamiento.

CAPITULO 6

6.1.- CONCLUSIONES

- Se logró determinar la actividad citotóxica y anticancerígena de 16 compuestos derivados de Azetidin-2-ona, a través del ensayo de viabilidad y proliferación celular con el reactivo WST-1.
- El compuesto C-089 presenta una selectividad hacia líneas celulares cancerígenas (SiHa y B16F10), mientras que en células Chang presenta una actividad citotóxica menor. Lo que lo convierte en un compuesto prometedor comparado con la Vincristina
- Se demostró la actividad apoptótica de los compuestos cabeza de serie de los derivados de azetidin-2-ona, por medio del ensayo de caspasa-3. Siendo utilizado como control y referencia la podofilotoxina.
- Además se logró demostrar a través de un análisis de la expresión génica en un microarreglo de DNA de ratón, que el compuesto C-089 induce una expresión génica asociada con las vías metabólicas para la muerte celular por apoptosis y la remodelación del citoesqueleto.
- Los ligandos correspondientes a los derivados de azetidin-2-ona estudiados, tienen una potencial afinidad con el sitio de unión de la colchicina a la β -Tubulina, que involucra los aminoácidos Cys 239, Lys 252, Val 316, Lys 350, Leu 246 y Ala 248.
- La vincristina no presenta una afinidad por el sitio de unión de la colchicina a la β -Tubulina.

- Los ligandos correspondientes a los derivados de azetidin-2-ona estudiados no presentan afinidad al sitio de unión de la vincristina a la β -Tubulina.
- El compuesto C-089 tiene una posible mayor afinidad que la colchicina al sitio de unión de la β -Tubulina. Presentando mayor interacción con los residuos de aminoácidos Cys 239, Lys 252, Val 316, Lys 350, Leu 246 y Ala 248 de la β -Tubulina.

6.2.- PERSPECTIVAS

- De acuerdo a los antecedentes de Carr y colaboradores, sería interesante hidroxilar en posición meta los 4-fenoxi para evaluar si mejoran la efectividad sin perder la especificidad.
- Los resultados del análisis de expresión génica podrían corroborarse con estudios de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.
- El siguiente paso sería realizar las pruebas del compuesto C-089 y algunos otros derivados prometedores en modelos *in vivo*, evaluando si realmente conservan la especificidad mostrada *in vitro*.

6.3.- REFERENCIAS

- 1.- Organización Mundial de la Salud (2013). Nota descriptiva del Cáncer. Revisado en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>. Marzo del 2012.
- 2.- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2013). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer datos nacionales. Revisado en: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2011/cancer11.asp?s=inegi&c=2780&ep=50>. Abril del 2012
3. - Geoffrey M. Cooper, Robert E. Hausman. “La Célula”. Marban Libros, S.L. Ed 1. 2006. Pág. 631-634
- 4.- Instituto nacional de cancer en estados unidos (2013). Factores de riesgos. Revisado en: <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/necesita-saber/cancer/page3>. Abril del 2012
- 5.-American Association of Cancer (2013).Revisado en línea:Quimioterapia. http://www.cancer.org/docroot/ESP/content/ESP_2_1x_Quimioterapia_Una_guía_para_los_pacientes_y_sus_familias.asp. 2011. Marzo 2012
- 6.- Goodman Gilman A. (2002) Las bases farmacológicas de la terapéutica. Editorial MC Graw Hill. Editores Hardman y Limbird. Seccion IX. Pajinas 1397-1476.
- 7.- Parul, D.; Sengar, N.P.; Pathak. A.K.(2010). 2-Azetidinone -A new profile of various pharmacological activities.*Eur J Med Chem.* 45 5541-5560
- 8.-Banik, I.; Becker, F.; Banik, B.K. (2003). Stereoselective synthesis of β -lactams with polyaromatic imines: entry to new and novel anticancer agents. *J. Med Chem.* 46 (1):12-15.

- 9.-Banik, B.K.; Becker, F.; Banik, I. (2004). Synthesis of anticancer β -lactams: mechanism of action. *Bioorg Med Chem.* 12: 2523-2528.
- 10.-Banik, B.K.; Becker, F.; Banik, I. (2005). Stereocontrolled synthesis of anticancer β -lactams via the Staudinger reaction. *Bioorg Med Chem.* 13:3611 3622.
- 11.-Jarrahpour, A.; Zarei, M. (2007). Synthesis of Novel N-(4-Ethoxyphenyl) Azetidin-2-ones and Their Oxidative N-Deprotection by Ceric Ammonium Nitrate. *Molecules.* 12:2364-2379.
- 12.- Frezza, M.; Garay, J.; Chen, D.; Cui, C.; Turos, E.; Dou, P.Q. (2008). Induction of tumor cell apoptosis by a novel class of *N*-thiolated β -lactam antibiotics with structural modifications at N1 and C3 of the lactam ring. *Int J Mol Med.* 21: 689-695
- 13.-Banik, B.K.; Becker, F.; Banik, I. (2010). Asymmetric synthesis of anticancer β -lactams via Staudinger reaction: utilization of chiral ketene from carbohydrate. *Eur J Med Chem.* 45:845–848.
- 14.- Carr, M.; Greene, L.M.; Knox, J.S.; Lloyd, D.G.; Zisterer, D.M.; Meegan, M.J. (2010). Lead identification of conformationally restricted β -lactam type combretastatin analogues: Synthesis, antiproliferative activity and tubulin targeting effects. *Eur J Med Chem.* 45:5752-5766
- 15.-O’Boyle, N.M.; Carr, M.; Greene, L.M.; Bergin, O.; Nathwani, S.M.; McCabe, T.; Lloyd, D.G.; Zisterer, D.M.; Meegan, M.J. (2010). Synthesis and Evaluation of Azetidinone Analogues of Combretastatin A-4 as Tubulin Targeting Agents. *Eur J Med Chem.* 53, 8569–8584

- 16.- O'Boyle, N.M.; Carr, M.; Greene, L.M.; Keely, N.O.; Knox, A.J.; McCabe, T.; Lloyd, D.G.; Zisterer, D.M.; Meegan, M.J. (2011). Synthesis, biochemical and molecular modelling studies of antiproliferative azetidinones causing microtubule disruption and mitotic catastrophe. *Eur J Med Chem.* 46 4595-4607.
- 17.-Lagunin, A.; Stepanchikova, A.; Filimonov, D Poroikov V. (2000). PASS: Prediction of Activity Spectra for Substances. *Bioinformatics application note.*16:747-748.
- 18.- Olazarán, F. E. (2011). Síntesis y evaluación *in silico* de la actividad biológica de nuevos derivados de *N*-(4-metoxifenil)-3-fenoxi-azetidin-2-ona con potencial actividad anticancerígena. Tesis de Licenciatura. UAMRA. UAT. Cd. Reynosa, Tamaulipas. México
- 19.- Pérez, A. M. (2011). Síntesis y evaluación *in silico* de la actividad biológica de nuevos derivados de azetidin-2-onas con potencial actividad anticancerígena. Tesis de Licenciatura. UAMRA. UAT. Cd. Reynosa, Tamaulipas. México
- 20.- Hay, R. J., Caputo, J. L., and Macy, M. L., Eds. (1992), ATCC Quality Control Methods for Cell Lines. 2nd edition, Published by ATCC.
- 21.-Caputo, J. L., Biosafety procedures in cell culture (1988). *J. Tissue Culture Methods* 11:223-227
- 22.-Fleming, D.O., Richardson, J. H., Tulis, J.J. and Vesley, D., (1995) Laboratory Safety: Principles and Practice. Second edition, ASM press, Washington, DC.
- 23.-Berridge, M.V. et.al (1996). The Biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemical* 4.15-19.
- 24.-Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J ImmunolMethods.* 16;65(1-2):55-63.

- 25.-Saha S, Verma R (2012).Potencial inhibitorio de hierbas tradicionales sobre la actividad de α -amilasa. . *Biol. Pharm Mar*, 50 (3) :326-31
- 26.-Jaeschke H., et al. (1998). Activation of Caspase 3 (CPP32)-like proteases is essential for TNF- α -induced hepatic parenchymal cell apoptosis and neutrophil-mediated necrosis in a murine endotoxin shock model. *J. Immunol.* 160(7):3480-3486.
- 27.-Flores, H.O.; Riveros, R.H; Sosa, P.A.; Vázquez, C.E. (2003). Mensaje Bioquímico, Volumen XXVII. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO.
- 28.-Chomczynski P, Sacchi N, Single-Step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem* 1987.162(1): 156-9
- 29.- Jamilet Miranda, Ricardo Bringas (2008).Análisis de datos de microarreglos de ADN. Parte II: Cuantificación y análisis de la expresión génica.*Biotecnología Aplicada* 2008;25:290-300
- 30.-Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA(2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc.*2009;4(1):44-57.
- 31.-N. Eswar, M. A. Marti-Renom, B. Webb, M. S. Madhusudhan, D. Eramian, M. Shen, U. Pieper, A. Sali (2006). Comparative Protein Structure Modeling With MODELLER. Current Protocols in Bioinformatics, John Wiley & Sons, Inc., Supplement 15, 5.6.1-5.6.30
- 32.-Ambrish Roy, Jianyi Yang, Yang Zhang (2012). COFACTOR: An accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation. *Nucleic Acids Research*, 40: 471-477

- 33.- Marcus D Hanwell, Donald E Curtis, David C Lonie, Tim Vandermeersch, Eva Zurek, and Geoffrey R Hutchison (2012). Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminform.* 4: 17.
- 34.-O. Trott, A. J. Olson, (2010).AutoDockVina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *Journal of Computational Chemistry* 31 455-461
- 35.-L Rickardson, M Fryknas, S Dhar, H Lovborg, J Gullbo, M Rydaker, P Nygren, MG Gustafsson R Larsson and A Isaksson.(2005). Identification of molecular mechanisms for cellular drug resistance by combining drug activity and gene expression profiles. *British Journal of Cancer* 93, 483–492
- 36.-PelinMutlu, AliUgur Ural, UfukGunduz.(2012).Differential oncogene-related gene expressions in myeloma cells resistant to prednisone and vincristine. *Biomedicine&Pharmacotherapy*66 506–511

6.4.- RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Fabián Eliseo Olazarán Santibáñez

Candidato para obtener el grado de Maestro en Ciencias con orientación en Farmacia

Tesis: Evaluación del efecto celular y molecular de derivados de azetidin-2-onas sobre líneas celulares cancerígenas.

Campo de estudio: Farmacia

Biografía: Nacido en Cd. Victoria Tamaulipas México, el 11 de octubre de 1988, hijo de Santos Olazarán Zapata y Hermelinda Santibáñez Vázquez

Educación: Egresado en 2010 de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo, en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Tamaulipas